
Optimierung der quantitativen Gelelektrophorese
für die pharmazeutische Analytik

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Xi Deng
aus Shanghai / China

1. Referent: Professor Dr. Hermann Wätzig
2. Referent: apl. Professor Dr. Dirk Selmar
eingereicht am: 19.12.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 21.03.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schröder, S., Brandmüller, A., Deng, X., Ahmed, A. & Wätzig, H. Improving precision in gel electrophoresis by stepwisely decreasing variance components – and considering individual protein properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50: 320-327 (2009).

Deng, X., Schröder, S., Redweik, S. & Wätzig, H. Quantitative gel electrophoresis: New records in precision by elaborated staining and detection protocols. *Electrophoresis* 32: 1667-1674 (2011).

Deng, X., Hahne, T., Schröder, S., Redweik, S., Nebija, N., Schmidt, H., Janßen, O., Lachmann, B. & Wätzig, H. The challenge to quantify proteins with charge trains due to isoforms or conformers. *Electrophoresis* 33: 263-269 (2012).

Tagungsbeiträge

Deng, X., Rohrer, S., Schröder, S. & Wätzig, H.: Outlier identification using R-NN curves combined with other conventional algorithms. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Bonn (2008).

Schröder, S., Brandmüller, A., Deng, X., Ahmed, A. & Wätzig, H.: Improving precision in gel electrophoresis by stepwise decrease of variance components – and considering individual protein properties. (Poster) Proteomic Forum, Berlin (2009).

Schröder, S., Brandmüller, A., Deng, X., Ahmed, A. & Wätzig, H.: Improving precision in gel electrophoresis by stepwise decrease of variance components – and considering individual protein properties. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Jena (2009).

Deng, X., Schröder, S., Redweik, S., Brandmüller, A., Ahmed, A. & Wätzig, H.: Data quality in gel electrophoresis – a necessity for quality control and proteomics. (Poster) Microscale Bioseparations, Prag (2010).

Redweik, S., Deng, X. & Wätzig, H.: Influences on protein properties. (Poster) Microscale Bioseparations, Prag (2010).

Redweik, S., Deng, X. & Wätzig, H.: A study of influences on properties using affinity capillary electrophoresis. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Braunschweig (2010).

Deng, X. & Wätzig, H.: Review at a glance: Different approaches towards precise protein quantification. (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Braunschweig (2010).

Deng, X., Schröder, S., Redweik, S. & Wätzig, H.: Optimized precision in quantitative gel electrophoresis: New records by elaborated staining and detection protocols. (Vortrag) DPhG-Doktorandentagung, Usedom (2011).

Deng, X., Hahne, T., Schröder, S., Redweik, S. & Wätzig, H.: The challenge to quantify proteins with “charge train” isoforms. (Poster) Proteomic Forum, Berlin (2011).

Deng, X., Rohrer, S., Schröder, S., Hahne, T. & Wätzig, H.: Improved Outlier Detection using the Combination of R-NN Curves with other conventional Algorithms. (Poster) 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapest (2011).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig unter Anleitung von Herrn Prof. Hermann Wätzig angefertigt, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung und die aufbauenden Diskussionen danken möchte.

Prof. Dirk Selmar danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Außerdem möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts der Medizinischen und Pharmazeutischen Chemie danken für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei meinen Arbeitskreiskolleginnen und -kollegen Dr. Simone Schröder, Dr. Adhitasari Suratmann, Dr. Sami El Deeb, Dr. Lukas Kaminski, Sascha Kühne, Claudia Cianciulli, Sabine Redweik, Sandra Grotefend, Thomas Hahne und Tobias Rakow möchte ich mich herzlich bedanken für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Petra Reich und Frank Riese für die technische Unterstützung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Lothar Jänsch und seiner Arbeitsgruppe am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für die Ermöglichung der experimentellen Arbeiten sowie die fachliche Unterstützung. Rainer Munder danke ich für die technische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | 1 |
| 2. THEORETISCHER TEIL..... | 4 |
| 2.1 Gelelektrophorese der Proteine | 4 |
| 2.1.1 Einsatzgebiete der Gelelektrophorese | 4 |
| 2.1.2 Theoretische Grundlagen..... | 8 |
| 2.1.2.1 Elektrophoretische Mobilität | 8 |
| 2.1.2.2 Elektroendoosmose..... | 15 |
| 2.1.3 Instrumenteller Aufbau der Gelelektrophorese..... | 17 |
| 2.1.3.1 Spezielle Geräte | 17 |
| 2.1.3.2 Häufig verwendete Träger für die Elektrophorese | 20 |
| 2.1.4 Verschiedene Trenntechniken der Gelelektrophorese | 23 |
| 2.1.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese (1-DE) | 24 |
| 2.1.4.1.A Disk-Elektrophorese nach Ornstein und Davis | 24 |
| 2.1.4.1.B SDS-Disk-Elektrophorese..... | 28 |
| 2.1.4.1.C Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 30 |
| 2.1.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) | 34 |
| 2.1.5 Färben und Detektieren | 37 |
| 2.1.5.1 Färbe- und Markierungsmethoden | 37 |
| 2.1.5.1.A Organische Farbstoffe | 38 |
| 2.1.5.1.B Silberfärbung | 40 |
| 2.1.5.1.C Fluoreszenzfärbung..... | 41 |
| 2.1.5.1.D Radioaktive Markierung..... | 42 |
| 2.1.5.1.E Zink-Imidazol-Färbung..... | 42 |
| 2.1.5.1.F Differenzgelelektrophorese | 43 |
| 2.1.5.2 Detektionssysteme | 44 |
| 2.2 Validierung einer Analysenmethode..... | 48 |
| 2.2.1 Begriffsdefinitionen..... | 49 |
| 2.2.1.1 Präzision und Richtigkeit | 49 |
| 2.2.1.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)..... | 52 |

| | |
|---|---------------|
| 2.2.1.3. Linearität..... | 53 |
| 2.2.1.4. Detektionsgrenze und Bestimmungsgrenze | 53 |
| 2.2.2 Statistische Beurteilung von Versuchsergebnissen | 53 |
| 2.2.2.1 Allgemeines..... | 53 |
| 2.2.2.2 Aufstellen einer Hypothese..... | 56 |
| 2.2.2.3 Prüfung einer Hypothese..... | 56 |
| 2.2.2.4 Fällung der Entscheidung..... | 57 |
| 2.2.3 Häufig verwendete statistische Testungen..... | 58 |
| 2.2.3.1 Der F-Test | 58 |
| 2.2.3.2 Der t-Test (Student´s t-test)..... | 60 |
| 2.2.3.3 Ausreißertests | 62 |
| 3. VARIANZQUELLEN DER GELELEKTROPHORESE, STAND DER TECHNIK | 63 |
| 4. PRÄZISION DER 1-DIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESE (1-DE)..... | 67 |
| 4.1 Optimierung der Detektion | 67 |
| 4.2 Die Bedeutung von Standardarbeitsanweisungen (SOPs) | 72 |
| 4.3 Varianzanalyse der Schüttelgeschwindigkeitsabhängigen Präzision | 77 |
| 4.4 Die Coomassie-Färbelösung: Varianz der Chargen | 82 |
| 4.4 Methodenvalidierung..... | 86 |
| 4.4.1 Linearität | 86 |
| 4.4.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis..... | 88 |
| 4.4.3 Reproduzierbarkeit..... | 90 |
| 4.4.4 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze..... | 91 |
| 4.5 Zusammenfassung | 92 |

| | |
|---|------------|
| 5. PRÄZISION DER 2-DIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESE (2-DE): QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN MIT SCHEINBAREN LADUNGSUNTERSCHIEDEN..... | 93 |
| 5.1 Isoelektrischer Punkt (pI): Definition und Berechnung..... | 93 |
| 5.2 Ursachen für Ladungsheterogenitäten bei Proteinen | 94 |
| 5.2.1 Post-translationale Modifikation (PTM) | 95 |
| 5.2.2 Artefakt-Bildung | 96 |
| 5.2.3 Konformer- und Komplexbildung..... | 97 |
| 5.3 Re-Elektrophorese als Beweis für die Konformeren-Theorie | 98 |
| 5.4 Methodenvalidierung..... | 100 |
| 5.4.1 Linearität | 100 |
| 5.4.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) | 100 |
| 5.4.3 Reproduzierbarkeit..... | 100 |
| 5.4.3.1 BSA | 102 |
| 5.4.3.2 Myoglobin | 103 |
| 5.4.3.3 Matuzumab..... | 104 |
| 5.4.3.4 Ovalbumin | 105 |
| 5.4.3.5 β -Laktoglobulin | 105 |
| 5.4.4 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze..... | 105 |
| 5.5 Zusammenfassung..... | 106 |
| 6. DETEKTION VON MULTIPLLEN AUSREIßERN..... | 108 |
| 6.1 Definitionen..... | 108 |
| 6.1.1 Extremwerte - Ausreißer | 108 |
| 6.1.2 „Masking“ und „Swamping“ | 109 |
| 6.1.3 Test-Schärfe und Sicherheit..... | 110 |
| 6.2 Konventionelle Ausreißertests..... | 111 |
| 6.2.1 Grubbs-Test | 111 |
| 6.2.2 Nalimov-Test..... | 111 |
| 6.2.3 Dixon-Test..... | 112 |

| | |
|--|------------|
| 6.3 Robuste Statistik | 113 |
| 6.3.1 Boxplot..... | 113 |
| 6.3.2 Median Absolute Deviation (MAD) | 114 |
| 6.4 Erzeugung der Datensätze..... | 115 |
| 6.5 Guha´s RNN Curve Algorithmus..... | 116 |
| 6.6 Auswertung der Tests | 117 |
| 6.7 Beurteilung der Güte der Ausreißerdetektion: | |
| Empfängerarbeitscharakteristik-Kurve oder Receiver Operating | |
| Characteristics (ROC) Curves..... | 119 |
| 6.8 Beurteilung der Güte der Ausreißertests und ihrer Kombinationen mit dem | |
| R-NN Curve Algorithmus..... | 121 |
| 6.9 Zusammenfassung | 124 |
| 7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 125 |
| 8. EXPERIMENTELLER TEIL | 128 |
| 8.1 Apparative Ausstattung und Software..... | 128 |
| 8.1.1 1-D-Gelelektrophorese-Systeme..... | 128 |
| 8.1.2 2-D-Gelelektrophorese-Systeme..... | 128 |
| 8.1.3 Scanner und Detektoren | 129 |
| 8.1.4 Weitere Geräte..... | 129 |
| 8.1.5 Software..... | 129 |
| 8.2 Verwendete Reagenzien und Lösungen | 130 |
| 8.3 1-D-Gelelektrophorese (1-DE)..... | 132 |
| 8.3.1 Probenvorbereitung..... | 132 |
| 8.3.2 SDS-PAGE | 133 |
| 8.3.3 Färbung..... | 135 |
| 8.3.4 Detektion..... | 136 |
| 8.3.5 Bildverarbeitung | 136 |

| | |
|--|------------|
| 8.3.6 Einfluss der Temperatur auf die Präzision während Färben und Entfärben | 137 |
| 8.3.7 Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit während des Färbens und Entfärbens auf die Präzision | 137 |
| 8.3.8 Abhängigkeit der Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung von der Zeit, Reagenzien und Analytiker | 138 |
| 8.4 2-D-Gelelektrophorese (2-DE)..... | 138 |
| 8.4.1 Gießen der SDS-PAGE-Gradientengele | 138 |
| 8.4.2 Vorbereitung zur IEF | 142 |
| 8.4.3 Experiment 1: Temperatureinfluss auf 2-DE | 144 |
| 8.4.3.1 IEF | 144 |
| 8.4.3.2 Äquilibration | 144 |
| 8.4.3.3 SDS-PAGE | 145 |
| 8.4.3.4 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang | 145 |
| 8.4.3.5 Detektion | 146 |
| 8.4.4 Experiment 2: Reproduzierbarkeit..... | 146 |
| 8.4.4.1 IEF | 146 |
| 8.4.4.2 Äquilibration | 147 |
| 8.4.4.3 SDS-PAGE | 147 |
| 8.4.4.4 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang | 147 |
| 8.4.4.5 Detektion | 147 |
| 8.4.4.6 Bildbearbeitung | 147 |
| 8.4.5 Experiment 3: Re-Elektrophorese | 149 |
| 8.4.5.1 IEF und SDS-PAGE (1. Lauf) | 149 |
| 8.4.5.2 Imidazol-Zink-Färbung..... | 149 |
| 8.4.5.3 IEF und SDS-PAGE (2. Lauf) | 149 |
| 8.4.5.4 SDS-PAGE, Färbung und Detektion..... | 150 |
| 9. ANHANG | 151 |
| 10. LITERATURVERZEICHNIS..... | 164 |
| 11. LEBENSLAUF | 175 |

Symbole

| | |
|---|--|
| a | Masse des Acrylamids [g] |
| A | Absorption |
| α | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| b | Masse des Quervernetzlers (z. B. <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid) [g] |
| c | molare Konzentration der absorbierenden Substanz [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] |
| C | Vernetzungsgrad [%] |
| CV | Variationskoeffizient (Engl.: coefficient of variation) |
| d | Abstand zwischen den Elektroden [m] |
| D | Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$] |
| df | Freiheitsgrad (Engl.: degree of freedom) |
| d_s | Schichtdicke [mm] |
| e | elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A·s] |
| E | elektrische Feldstärke [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$] |
| ϵ | Dielektrizitätspermeabilität [$\text{F}\cdot\text{m}^{-1}$] |
| ϵ_x | molarer Absorptionskoeffizient [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$] |
| f_c | Reibungskoeffizient [$\text{J}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$] |
| F | Faradaysche Konstante [$96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$] |
| F_0 | berechneter F-Wert |
| F_e | beschleunigende Kraft [N] |
| F_F | Reibungskraft [N] |
| F_{Rel} | Relaxationskraft [N] |
| F_{Ret} | Retardationskraft [N] |
| F_{krit} bzw. $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$ | tabellierter, kritischer F-Wert |
| h | maximale Höhe des Untergrundrauschens [cm] |
| H | Höhe des Signals [cm] |
| h_o | Median oberen Quartils (Box-Plot) |
| h_u | Median unteren Quartils (Box-Plot) |
| H_0 | Nullhypothese |
| H_1 | Alternativhypothese |
| I | Stromstärke [A] |
| I_0 | Intensität der eintretenden Wellenlänge |

| | |
|--------------------------------|---|
| I_x | Intensität der austretenden Wellenlänge |
| IQR | Interquartilsabstand |
| J | Joulesche Wärme [$\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$] |
| k | Proportionalitätsfaktor |
| k_b | Boltzmann-Konstante [$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$] |
| K_a | Säurekonstante |
| κ | Debye-Hückel Parameter [m^{-1}] |
| L_{ges} | Abstand zwischen den Elektroden [m] |
| m | Anzahl der Gele |
| m | Masse [g] |
| M | Molekularmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] |
| MAD | mediane absolute Abweichung |
| μ | Mobilität [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| μ | Mittelwert der Grundgesamtheit |
| μ_{eff} | effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| μ_{EOF} | Mobilität vom elektroosmotischen Fluss [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens i [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| μ_{∞} | absolute elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| n | Anzahl |
| η | Viskosität eines Mediums [$\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$] |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus einer Hydroxoniumionen-Konzentration |
| $\text{p}K_a$ | negativer dekadischer Logarithmus einer Dissoziationskonstante einer Säure |
| P | elektrische Leistung [W] |
| Q | Ladung eines Teilchens [A·s] |
| r | Radius eines Teilchens [m] |
| R | molare Gaskonstante [8318,41 J/(kmol·K)] |
| R_f | Relative Mobilität |
| RSD% | prozentuale relative Standardabweichung |
| $\text{RSD}\%_{\text{pooled}}$ | gepoolte relative Standardabweichung |
| s | Wanderungsstrecke eines Proteins [m] |
| s_0 | Wanderungsstrecke einer Lauffront [m] |
| S_i | Ionenstärke einer Lösung [$\text{kmol}\cdot\text{m}^{-3}$] |

| | |
|------------------|--|
| S/N | Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Engl.: signal-to-noise ratio) |
| σ | Standardabweichung einer Grundgesamtheit |
| σ^2 | Varianz einer Grundgesamtheit |
| $\hat{\sigma}$ | Standardabweichung einer Stichprobe |
| $\hat{\sigma}_r$ | Wiederhol-Standardabweichung einer Stichprobe |
| $\hat{\sigma}^2$ | Varianz einer Stichprobe |
| t | t-Faktor |
| T | Temperatur [K] |
| T' | Gesamtacrylamidkonzentration [%] |
| U | elektrische Spannung [V] |
| v_{EOF} | Wanderungsgeschwindigkeit des EOFs [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| v_i | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] |
| V | Volumen einer Lösung [ml] |
| \bar{x} | arithmetischer Mittelwert |
| X | spezifischer Faktor für eine Molekülart |
| Y_0 | Relative Mobilität unabhängig von der Matrix |
| z | Anzahl der Ladungen eines Teilchens |
| ζ | Zeta-Potenzial [V] |

Abkürzungen

| | |
|----------|---|
| 1-DE | eindimensionale Gelelektrophorese |
| 2-DE | zweidimensionale Gelelektrophorese |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BIS | Bisacrylamid (<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid) |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CA | Carboanhydrase |
| CAF | Celluloseacetatfolie |
| CBB | Coomassie Brilliant Blau (Engl.: Coomassie Brilliant Blue) |
| CCB | kolloidale Coomassie-Blau-Färbung (Engl.: Colloidal Coomassie Blue Stain) |
| CE | Kapillarelektrophorese (Engl.: capillary electrophoresis) |
| CHAPS | 3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium)-1-propansulfonat |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromid |
| Disk | diskontinuierliche Elektrophorese |
| DL | Nachweisgrenze (Engl.: detection limit) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EOF | Elektroosmotischer Fluss |
| HIC | Hydrophobe Interaktionschromatographie |
| ICH | International Conference on Harmonisation |
| IEC | Ionenaustauschchromatographie (Engl.: ion-exchange chromatography) |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IPG | immobilisierter pH-Gradient |
| IS | interner Standard |
| M | Messung |
| MS | Massenspektrometrie |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| Ph. Eur. | Europäisches Arzneibuch |
| PMT | Photo-Multiplier-Tube |
| PN | Probenahme |
| PV | Probenvorbereitung |

| | |
|----------|--|
| PTM | post-translationale Modifikation |
| QL | Bestimmungsgrenze (Engl.: quantitation limit) |
| R-NN | Radius-Anzahl der Nachbarn (Engl.: radius – number of neighbors) |
| RPC | reversed-phase Chromatographie |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (Engl.: sodium dodecyl sulfate) |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEC | Größenausschlusschromatographie (Engl.: size exclusion chromatography) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| USP | United States Pharmacopeia |

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Elektrophorese beschreibt die Auftrennung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld [1]. Die bekannteste Methode der 1-dimensionalen Gelelektrophorese (1-DE) mit Natriumdodecylsulfat und Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) wurde bereits in den Sechzigerjahren zur Größenbestimmung von Proteinen entwickelt [2]. Die Bestimmung einer weiteren charakteristischen Größe von Proteinen, des isoelektrischen Punktes (pI), konnte mit dem Einsatz der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mittels Trägerampholyte nach Svensson-Rilbe 1966 realisiert werden [1].

Die Forscher O'Farrell und Klose machten unabhängig voneinander 1975 die wohl auflösungsstärkste Elektrophoresetechnik, die 2-dimensionale Gelelektrophorese (2-DE), publik. Sie ist eine Kombination aus IEF und SDS-PAGE. Damit war eine Trennung nach isoelektrischen Punkten und der Molekulargröße möglich [3, 4]. Tausende Proteinspots konnten somit simultan auf einem einzigen Gel aufgetrennt werden [5]. Ein weiterer Fortschritt wurde durch die Entwicklung des immobilisierten pH Gradienten (IPG) für die IEF erzielt, die entscheidend die Reproduzierbarkeit und die Handhabung der 2-DE verbesserte [6].

Die eindimensionale Gelelektrophorese (1-DE) wird heutzutage in den meisten Forschungslaboren, die mit Proteinen arbeiten, und in der Qualitätskontrolle der pharmazeutischen Industrie zur Untersuchung der Identität und Reinheit verwendet [7]. Die 2-DE findet man vor allem in der Proteomforschung (z. B. in der Biomarkerforschung) zur Untersuchung komplexer Proben (Seren, Zellenlysate etc.) [8]. In der Proteomforschung vergleicht man die Proteinkonzentrationen eines Organismus, einer Zelle oder eines Gewebes unter verschiedenen Bedingungen (z. B. krank und gesund) [9]. Dabei ist die Zu- bzw. Abnahme der Proteinkonzentration entscheidend.

Eines der wichtigsten Parameter für die Quantifizierung ist die Präzision [10]. Sie beschreibt den Grad der Übereinstimmung von Werten innerhalb einer Messreihe, die durch mehrfache Probennahme aus derselben homogenen Probe gewonnen wird [11]. Die Präzision lässt sich in prozentualer relativer Standardabweichung (RSD%) ausdrücken [7]. Eine gute Präzision liegt vor, wenn die Streuung der Messergebnisse

gering ist [12]. In der pharmazeutischen Qualitätskontrolle wird für die Quantifizierung der Hauptkomponente eine RSD% von 2 % angestrebt [10].

Obwohl die Gelelektrophorese bereits eine altbewährte Trenntechnik ist, lässt die Präzision dieser Methode noch sehr zu wünschen übrig. Als mittlere prozentuale relative Standardabweichung werden typischerweise Werte von 20 – 30 % für die 2-DE [13] genannt. Vor allem im Hinblick auf den wachsenden Markt der Biopharmazeutika ist die Verbesserung der Präzision der quantitativen Gelelektrophorese unabdingbar. Im Mai 2011 wurden in Deutschland bereits 144 Arzneimitteln mit 108 Wirkstoffen gentechnisch hergestellt [14].

Mit der Optimierung der Präzision der Gelelektrophorese hatten sich bereits einige Arbeitsgruppen beschäftigt [15–18]. Als Hauptvarianzfaktoren für die schlechte Präzision der 2-DE wurden die 2. Dimension, nämlich die der SDS-PAGE, und die Proteinfärbung genannt [19]. Als Hauptfehlerquelle wurde die unspezifische Hintergrundfärbung des Geles identifiziert [18, 20]. Die Fluoreszenzfärbung mit Sypro Ruby und auch die Coomassiefärbung zeigten eine schwankende Basislinie bei Betrachtung ihrer Elektropherogramme. Durch die Detektion im sichtbar-nahinfraroten (Vis-NIR) Licht von Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gelen wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) signifikant erhöht [21, 22] und dadurch die Präzision verbessert. Durch die Vis-NIR-Detektion von CCB-gefärbten 1-D-Gelen wurde bereits eine quantitative Reproduzierbarkeit von 3 – 10 % RSD% erreicht [23].

Da die schwankende Basislinie als Hauptfehlerquelle identifiziert worden ist, konnten mittels eines experimentellen Designs weitere mögliche Varianzquellen untersucht werden [20]. Dabei zeigten die Färb- und Entfärbeprozesse größere Effekte auf die Präzision der untersuchten Proteine. Daher war es notwendig, im ersten Teil dieser Arbeit die einzelnen Parameter während des Färbens und Entfärbens mittels einer größeren Gelanzahl ($n = 20$) genauer zu untersuchen [24]. Dies erfolgte unter Anwendung einer ausführlichen Standardarbeitsanweisung (SOP, Engl.: standard operating procedure), um die Parameter von jeden einzelnen Arbeitsschritt der 1-DE konstant zu halten.

Weitere Ziele dieser Arbeit sind die Aufklärung des Perlenketten-Symptoms von einigen Proteinen nach der Trennung mittels der 2-DE und ihre Quantifizierung [25]. Manche Proteine erscheinen auf 2-D Gelen nicht als einzelner Punkt, sondern in Form einer an eine Perlenkette erinnernde Reihe [26], d. h. es sind nur Unterschiede in isoelektrischen Punkten zu beobachten, nicht aber in der Masse. Einige mögliche Ursachen, die zur Ladungsheterogenität führen können, z. B. post-translationale Modifikationen [27], Artefakte [28, 29] oder Konformere [30, 31], werden in dieser Arbeit ausführlich diskutiert und die korrekte Quantifizierung dieser Proteine untersucht, um die Präzision der quantitativen 2-DE zu erhöhen.

Der dritte Teil dieser Arbeit behandelt die statistische Beurteilung von Messergebnissen, insbesondere die Identifizierung von Ausreißern. Ausreißer sind Extremwerte einer Messreihe, die starke Abweichung von den erwarteten Werten zeigen [32, 33]. Sie können in jeder Messreihe auftreten. Die jeweiligen Ursachen bedürfen weiterer Untersuchung.

Vor allem mit dem wachsenden Markt der Biopharmazeutika spielt Statistik in der pharmazeutischen Industrie eine immer größere Rolle [34]. Das Arzneibuch der USA (USP) enthält im Kapitel 1032 „Design und Entwicklung biologischer Assays“ einen eigenen Abschnitt über Ausreißeridentifizierung und -behandlung. Im Kapitel 1010 des USP werden einige konventionelle Ausreißertests beschrieben [35]. Auch in der von der Food and Drugs Administration (FDA) entwickelten Richtlinie für die pharmazeutische Industrie wird die Ausreißerproblematik explizit behandelt [36].

In diesem letzten Teil werden konventionelle Ausreißertests einzeln und in Kombination mit einem Algorithmus aus der Chemometrik, R-NN curves [37], im Hinblick ihrer Trennschärfe mit synthetischen Datensätzen bewertet.

2. Theoretischer Teil

2.1 Gelelektrophorese der Proteine

2.1.1 Einsatzgebiete der Gelelektrophorese

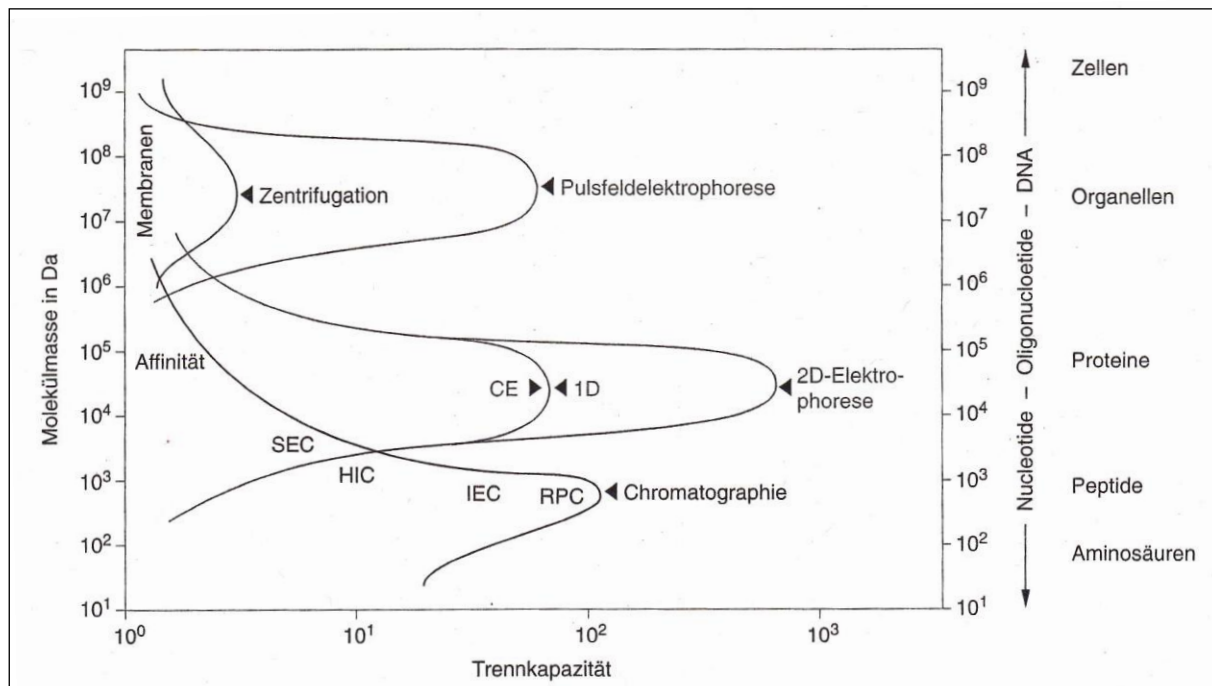


Abbildung 2-1: Übersicht über Trennmethode von Biomolekülen,

CE = Kapillarelektrophorese, SEC = Größenausschlusschromatographie, HIC = Hydrophobe Interaktionschromatographie, IEC = Ionenaustauschchromatographie, RPC = reversed-phase Chromatographie, aus [38].

Im Jahr 1982 wurde der erste Wirkstoff gentechnischen Ursprungs, das Insulin, zugelassen [39]. Seitdem sind Proteinpharmazeutika eine feste Größe auf dem Arzneimittelmarkt. Ihre Vorteile gegenüber den üblichen „kleinen Molekülen“ sind nicht zu verachten. Ihre Wirkung im Körper ist oftmals spezifischer und nebenwirkungsärmer [40]. Im Jahr 2002 waren 50 biotechnologisch hergestellte Arzneistoffe in Deutschland zugelassen [41]. Aktuell (Oktober 2011) sind den Angaben des Vereins forschender Arzneimittelhersteller (VFA) nach bereits 148 gentechnisch hergestellte Arzneimittel mit 111 Wirkstoffen auf dem deutschen Markt [14]. Weltweit sind über 200 gentechnisch hergestellte Wirkstoffe zugelassen, die v. a. in den Sparten Diabetes, Krebs, Wachstumsstörung, Blutarmut sowie Hepatitis ihren Einsatz finden [42].

Die Gelelektrophorese erlaubt die Trennung von Molekülen mit einer Masse von wenigen bis mehreren Hundert kDa (Abbildung 2-1). Zur Prüfung auf Identität und Reinheit dieser gentechnologisch hergestellten Arzneistoffe (z. B. Epoetin, Hepatitis-B-Antigen) und anderer nicht-gentechnologisch hergestellten Proteintherapeutika (z. B. Albumin, Heparin) werden vom Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) diverse Gelelektrophorese-Methoden wie Immunelektrophorese, Celluloseacetatfolien-Elektrophorese (CAF-Elektrophorese), isoelektrische Fokussierung (IEF), Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Agarose-Elektrophorese vorgeschrieben (Tabelle 2-1). Zum Teil wird die elektrophoretische Trennung mit weiteren nicht-elektrophoretischen Verfahren gekoppelt, ein Beispiel dafür ist die Identifizierungsmethode für Tetracosactid.

Obschon für die 2-DE in Form der IEF-SDS-PAGE vielversprechende Forschungsergebnisse vorliegen [43, 44], ist sie im Ph. Eur. noch für keine Substanz als Prüfmethode vorgeschrieben.

Im Ph. Eur. [45] und auch im USP [35] wird die Gelelektrophorese in der Monographie der allgemeinen Verfahren beschrieben. Hier findet man genaue Beschreibungen der Gelherstellung, Färbung und Validierungskriterien. Zusätzlich dazu werden in beiden Arzneibüchern die SDS-PAGE, die IEF und 2-DE als mögliche Analysemethoden für In-Prozesskontrolle und Qualitätskontrolle von Endprodukten in der Monographie „DNA-rekombinationstechnisch hergestellte Produkte“ aufgeführt. Darüber hinaus ist eine Beschreibung der Gelelektrophorese in der Monographie „Allergenzubereitungen“ des Ph. Eur. zu finden. Im USP wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der allgemeinen Monographie 1047 „biotechnology-derived articles tests“ aufgeführt.

Tabelle 2-1: Proteintherapeutika, die nach Ph. Eur. gelelektrophoretisch geprüft werden, aus [7].

| Monographie | Prüfung | Methode |
|----------------------------------|---------------------------|--|
| Albumin | Identität | Immunelektrophorese |
| | Reinheit | CAF-Elektrophorese |
| Allergenzubereitungen | Identität | Immunelektrophorese, |
| | Reinheit | SDS-PAGE, IEF |
| Alteplase | Kontrolle bei Herstellung | IEF, SDS-PAGE |
| Antithrombin III | Kontrolle bei Herstellung | Agarose-Elektrophorese |
| Blutgerinnungsfaktor VIII | Kontrolle bei Herstellung | SDS-Agarose-Elektrophorese |
| Corticotropin | Reinheit | PAGE |
| Erythropoetin | Identität | SDS-PAGE |
| Heparin | Identität | Agarose-Elektrophorese |
| Immunglobin vom Menschen | Identität | Immunelektrophorese |
| | Reinheit | CAF-Elektrophorese |
| Immunsera für Menschen | Reinheit | Gelelektrophorese |
| Immunsera für Tiere | Reinheit | Gelelektrophorese |
| Interferon alpha-2 | Identität | IEF, SDS-PAGE |
| | Reinheit | SDS-PAGE |
| Interferon gamma-1b | Identität | SDS-PAGE |
| | Reinheit | SDS-PAGE |
| Molgramostim | Identität | IEF, SDS-PAGE |
| | Reinheit | SDS-PAGE |
| Somatotropin | Identität | IEF |
| | Reinheit | IEF |
| Tetracosactid | Identität | CAF-Elektrophorese (2-D mit anschließender DC) |

Ein weiteres Einsatzgebiet der Gelelektrophorese stellt die Proteomforschung dar [46, 47]. Hier untersucht man die Veränderung der Proteinspezieszusammensetzung (z. B. Isoformen) unter unterschiedlichen Bedingungen, z. B. krank und gesund, und in unterschiedlicher Umgebung (Zelle, Gewebe) (Abbildung 2-2) [9, 48]. Damit möchte man bestimmte Proteine als Indikatoren für Krankheiten, auch Biomarker genannt, identifizieren. Ein etablierter Biomarker ist z. B. das EGF-Rezeptor-Protein (Engl.: epidermal growth factor receptor) für verschiedene Krebsarten (Kopf-, Hals-, Darmkrebs etc.) [49]. Bei Erkrankung ist die Konzentration dieses Proteins erhöht. Durch gezielte Blockierung durch einen monoklonalen EGFR-Antikörper wie Cetuximab kann das Wachstum von EGFR-positiven Tumoren gestoppt werden.

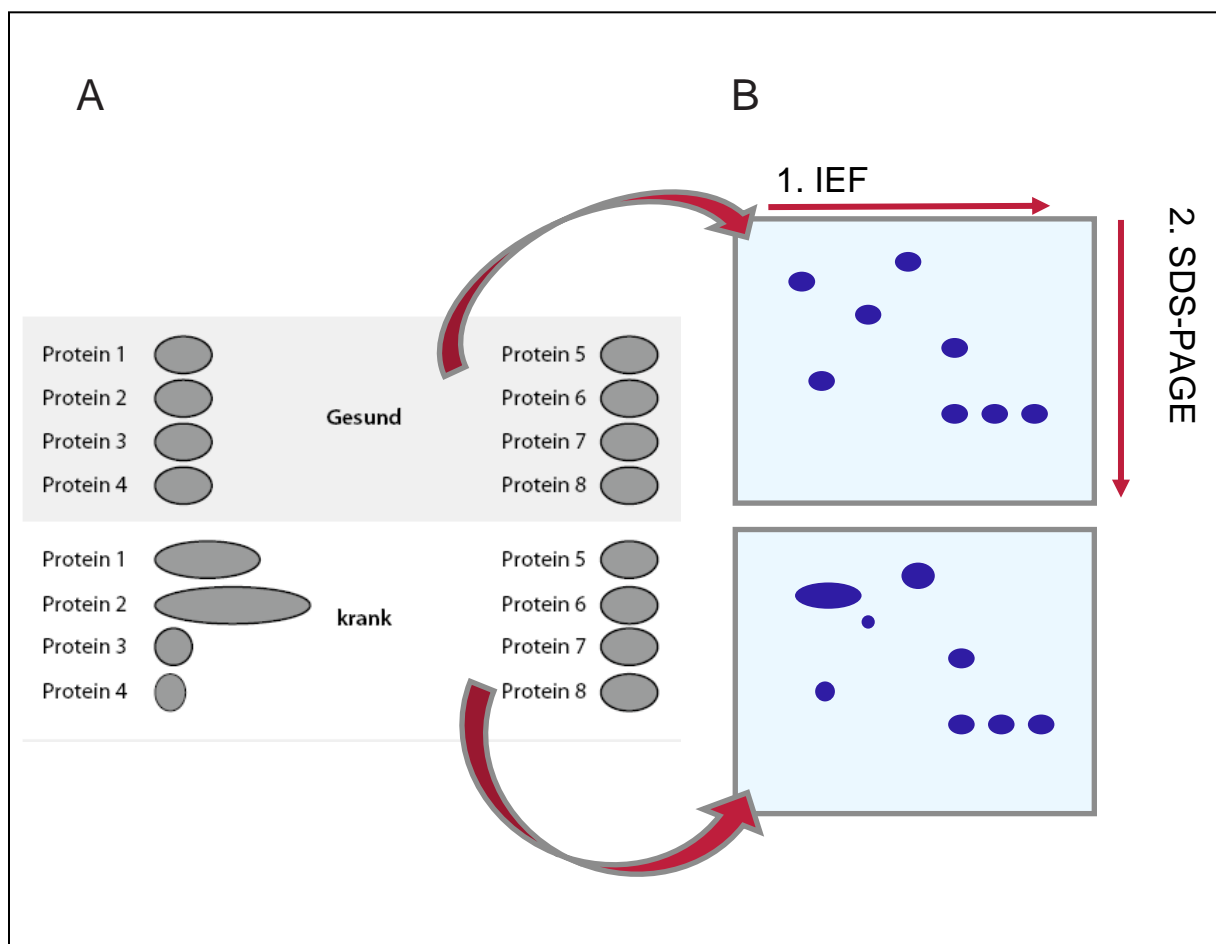


Abbildung 2-2:

(A) Modell-Beispiel für Proteinexpression eines gesunden und eines kranken Organismus, aus [9].

(B) Übertragung des Beispiels von (A) auf 2-D Gele.

Ein Biomarker kann (I) zur Diagnose dienen, ob eine Person krank oder gesund ist, (II) Voraussagen über Heilungschancen oder den Krankheitsverlauf machen und (III) eine Prävention oder Therapie erleichtern [50]. Vor allem bei schwer heilbaren und unheilbaren Krankheiten wie Brustkrebs [46], Nierenkrebs [51], Oralkrebs [52] oder Parkinson [53] ist man auf der Suche nach geeigneten Biomarkern [54, 55].

Neben der Gelelektrophorese existieren viele andere Methoden für die Proteinanalytik, wie CE [56, 57] oder LC-MS [58–60]. Trotzdem bleibt die 2-DE das Arbeitspferd der Proteomforschung [5]. Die 2-DE ist die Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen, denn mit ihr können gleichzeitig bis zu 10000 Proteinspezies in ihrer intakten Form untersucht werden [48, 61].

2.1.2 Theoretische Grundlagen

2.1.2.1 Elektrophoretische Mobilität

Die Elektrophorese beschreibt die Trennung von elektrisch geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Der substanzspezifische und für den Erfolg einer elektrophoretischen Trennung charakteristische Faktor ist die elektrophoretische Mobilität [1].

In einem elektrischen Feld wirken auf ein Teilchen mit der elektrischen Ladung Q diverse beschleunigende und bremsende Kräfte. Einerseits wird das Teilchen mit einer beschleunigenden Kraft F_e (Gleichung 1) zum elektrischen Gegenpol befördert.

$$F_e = Q \cdot E = z \cdot e \cdot E \quad \textbf{(Gleichung 1)}$$

| | |
|-------|--|
| F_e | beschleunigende Kraft [N] |
| Q | Ladung eines Teilchens [C] = [A·s] |
| E | Elektrische Feldstärke [V·m ⁻¹] |
| z | Anzahl der Ladungen eines Teilchens |
| e | elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A·s] |

Andererseits wirkt eine bremsende Reibungskraft F_f (Gleichung 2) der beschleunigenden Kraft F_e entgegen.

$$F_F = f_c \cdot v_\infty \quad \textbf{(Gleichung 2)}$$

| | |
|------------|---|
| F_F | Reibungskraft [N] |
| f_c | Reibungskoeffizient [J·s·m ⁻²] |
| v_∞ | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens in einer unendlich verdünnten Lösung [m·s ⁻¹] |

Für kugelförmige Teilchen ist das Gesetz von Stoke gültig (Gleichung 3), so dass für die Reibungskraft F_F gilt:

$$F_F = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_\infty \quad \textbf{(Gleichung 3)}$$

| | |
|------------|---|
| F_F | Reibungskraft [N] |
| η | Viskosität eines Mediums [N·s·m ⁻²] |
| r | Radius eines geladenen Teilchens [m] |
| v_∞ | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens in einer unendlich verdünnten Lösung [m·s ⁻¹] |

Die Reibungskraft F_F wird u. a. von der Viskosität eines Mediums η und in Gelen mit restriktiven Eigenschaften von der Porengröße beeinflusst [38]. Während der Elektrophorese stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der beschleunigenden Kraft F_e (Gleichung 1) und der bremsenden Reibungskraft F_F (Gleichung 2) ein (Gleichung 4),

so dass sich ein Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit v weiterbewegt (Gleichung 6). Indem man die elektrophoretische Kraft F_e (Gleichung 1) und die Reibungskraft F_F (Gleichung 3) gleichsetzt, lässt sich die Geschwindigkeit v_∞ berechnen (Gleichung 6).

$$F_e = F_F \quad \text{(Gleichung 4)}$$

$$z \cdot e \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_\infty \quad \text{(Gleichung 5)}$$

$$v_\infty = z \cdot e \cdot E / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r) \quad \text{(Gleichung 6)}$$

| | |
|------------|---|
| F_e | beschleunigende Kraft [N] |
| F_F | Reibungskraft [N] |
| v_∞ | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens in einer unendlich verdünnten Lösung [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| z | Anzahl der Ladungen eines Teilchens |
| e | elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A·s] |
| E | Elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| η | Viskosität eines Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$] |
| r | Radius eines geladenen Teilchens [m] |

Wie man Gleichung 6 entnehmen kann, so nimmt die Geschwindigkeit v_∞ proportional zur elektrischen Feldstärke E zu. Der Proportionalitätsfaktor wird Mobilität μ_∞ genannt und ist unter definierten Bedingungen eine stoffspezifische Größe (Gleichung 7):

$$\mu_\infty = \frac{v_\infty}{E} \quad \text{(Gleichung 7)}$$

| | |
|--------------|---|
| μ_∞ | absolute Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| v_∞ | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens in einer unendlich verdünnten Lösung [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| E | Elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |

Die Feldstärke E lässt sich wiederum über den Quotienten aus der angelegten Spannung U und des Abstandes zwischen den Elektroden L_{ges} berechnen (Gleichung 8) [7].

$$E = \frac{U}{L_{\text{ges}}} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

| | |
|------------------|---|
| E | elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| U | elektrische Spannung [V] |
| L_{ges} | Abstand zwischen den Elektroden [m] |

Für nicht-sphärische Teilchen wird eine Beziehung zwischen der Molekülmasse und der Mobilität angegeben (Gleichung 9). Der Quotient aus Ladung und Masse ist auch unter dem Begriff der Ladungsdichte bekannt. Die Größe des Faktors X ist von der Art des Moleküls abhängig und liegt zwischen $1/3$ und $2/3$. Für Peptide und Proteine beträgt er etwa $2/3$ [7].

$$\mu_{\infty} = k \cdot Q \cdot M^{-X} \quad \text{(Gleichung 9)}$$

| | |
|----------------|--|
| μ_{∞} | absolute elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| k | Proportionalitätsfaktor |
| Q | Ladung eines Teilchens [C] = [A·s] |
| M | Molekularmasse eines Teilchens [$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$] |
| X | spezifischer Faktor einer Molekülart |

Da sich das geladene Teilchen aber nicht nur in einer unendlich verdünnten Lösung fortbewegt, sondern zusammen mit adsorbierten Gegenionen, ergibt sich eine geringere elektrophoretische Mobilität μ_i als die absolute elektrophoretische Mobilität μ_{∞} (Gleichung 10) [1]:

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} \quad \text{(Gleichung 10)}$$

| | |
|---------|---|
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| v_i | Wanderungsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens i [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| E | Elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |

Über die Parameter pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur nimmt der Puffer auf die elektrophoretische Mobilität der Proteine Einfluss [1]. In unendlich verdünnten Lösungen gewinnen die beiden Kräfte, die Retardationskraft F_{Ret} und die Relaxationskraft F_{Rel} , an Bedeutung.

Der Debye-Hückel-Theorie nach befindet sich jedes geladene Teilchen inmitten einer Atmosphäre von Gegenionen (Abbildung 2-3). Der diffuse Teil dieser Ionenatmosphäre bewegt sich entgegen der Flussrichtung des zentralen Teilchens und erzeugt eine weitere Reibungskraft. Diese Kraft ist unter der Retardationskraft F_{Ret} bekannt (Abbildung 2-3). Eine weitere Kraft, die ebenfalls die Mobilität des Teilchens senkt, ist die Relaxationskraft F_{Rel} (Abbildung 2-3). Sie beschreibt die Kraft der Ionenwolke entgegengesetzter Ladungen, die dem Zentralteilchen während der Wanderung hinterherhinkt. Die Mobilität μ_i unter Berücksichtigung beider genannten Kräfte lässt sich aus Gleichung 11 berechnen [1]:

$$\mu_i = \mu_{\infty} - \frac{z \cdot e \cdot \kappa}{6 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{(Gleichung 11)}$$

| | |
|----------------|---|
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| μ_{∞} | absolute elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| z | Anzahl der Ladungen eines Teilchens |
| e | elektrische Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$) [A·s] |
| κ | Debye-Hückel Parameter [m^{-1}] |
| η | Viskosität eines Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$] |

Der Debye-Hückel Parameter κ ist der Reziprokwert der Dicke des diffusen Teiles der Ionenatmosphäre $1/\kappa$ (Gleichung 12) [1]:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{1}{F} \cdot \left(\frac{\varepsilon \cdot R \cdot T^{1/2}}{2 \cdot S_i} \right) \quad \text{(Gleichung 12)}$$

| | |
|---------------|--|
| κ | Debye-Hückel Parameter [m^{-1}] |
| F | Faradaysche Konstante [$96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$] |
| ε | Dielektrizitätspermeabilität [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| R | molare Gaskonstante [$8318,41 \text{ J}/(\text{kmol} \cdot \text{K})$] |
| T | Temperatur [K] |
| S_i | Ionenstärke einer Lösung [$\text{kmol} \cdot \text{m}^{-3}$] |

Aus den Gleichungen 11 und 12 folgt, dass die Relaxationskraft F_{Rel} und die Retardationskraft F_{Ret} mit steigender Ionenstärke zunehmen [38].

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen und anderen Ampholyten wird vom Puffer vor allem über den pH-Wert beeinflusst. Die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} ist von dem Dissoziationsgrad α abhängig. Für schwache Basen gilt Gleichung 13 [7]:

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_i \cdot \alpha = \mu_i \cdot \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+)}{c(\text{H}_3\text{O}^+) + K_A} = \mu_i \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad \text{(Gleichung 13)}$$

| | |
|---------------------------|---|
| μ_{eff} | effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| α | Dissoziationsgrad |
| $c(\text{H}_3\text{O}^+)$ | Konzentration der Hydroxoniumionen [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| K_A | Säurekonstante [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| pH | pH-Wert |
| pK_a | negativer dekadischer Logarithmus von K_A |

2.Theoretischer Teil

Für schwache Säuren gilt entsprechend Gleichung 14:

$$\mu_{\text{eff}} = -\mu_i \cdot \alpha = -\mu_i \cdot \frac{K_A}{c(\text{H}_3\text{O}^+) + K_A} = -\mu_i \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{p}K_a - \text{pH}}} \quad (\text{Gleichung 14})$$

| | |
|---------------------------|---|
| μ_{eff} | effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| α | Dissoziationsgrad |
| $c(\text{H}_3\text{O}^+)$ | Konzentration der Hydroxoniumionen [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| K_A | Säurekonstante [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| pH | pH-Wert |
| $\text{p}K_a$ | negativer dekadischer Logarithmus von K_A |

Die Temperatur des Puffers nimmt über die dynamische Viskosität η Einfluss auf die Mobilität. Je höher die Temperatur, desto niedriger ist die Viskosität, daraus ergibt sich eine Erhöhung der Mobilität (Gleichung 6).

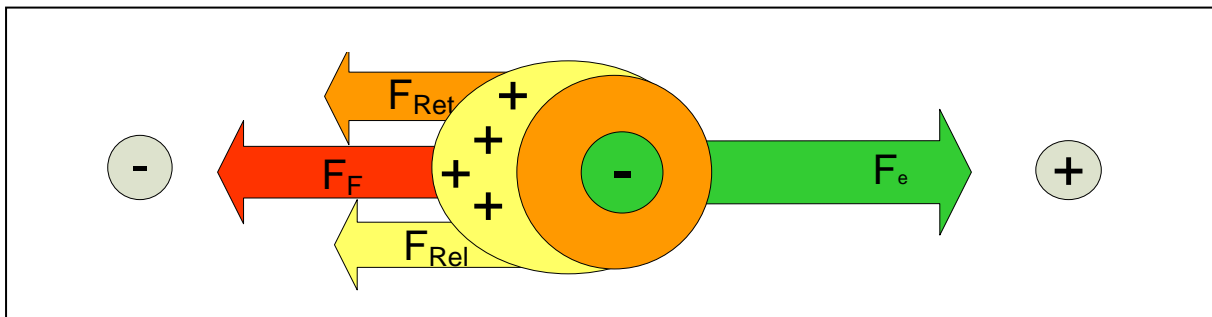


Abbildung 2-3: Beschleunigende Kraft (F_e = elektrophoretische Kraft) und bremsende Kräfte (F_F = Reibungskraft, F_{Rel} = Relaxationskraft, F_{Ret} = Retardationskraft), die auf geladene Teilchen im elektrischen Feld wirken.

2.1.2.2 Elektroendoosmose

Beim Kontakt mit Elektrolytlösungen bilden viele Materialien aufgrund ihrer Oberflächenladung eine elektrochemische Doppelschicht aus, die typischerweise eine Dicke von 1 – 100 nm besitzt (Abbildung 2-4). Vor allem bei Glas, Papier, Quarz, Agarose und Celluloseacetatfolien, die fixierte saure Gruppen tragen, ist diese Eigenschaft besonders stark ausgeprägt. Im Falle der Agarosegele, die fixierte deprotonierte Carboxylgruppen tragen, lagern sich Hydroniumionen oder andere Kationen aus der Elektrolytlösung an, um die negative Oberflächenladung zu kompensieren. Nach dem Modell von Stern bilden die direkt anlagernden Gegenionen eine starre, ortsgebundene Schicht, die auch Sternschicht oder innere Helmholtz-Schicht genannt wird. In dieser Schicht erfolgt die Potenzialabnahme linear. Weiter besteht eine diffuse Schicht frei beweglicher Ionen, die auch äußere Helmholtz-Schicht genannt wird. In dieser Schicht nehmen die Anzahl der Gegenionen und das Potenzial exponentiell ab. Wie schon in Gleichung 12 gezeigt wurde, reicht die diffuse Schicht mit abnehmender Ionenstärke weiter in die Lösung hinein. Wird bei der Elektrophorese eine Spannung angelegt, so werden Gegenionen und ihre Hydrathüllen aus dem Puffer an die Geloberfläche angezogen. Es ergibt sich ein zur Kathode gerichteter Fluss (EOF). Nur die fixierten Gegenionen und ein kleiner Teil der diffusen Schicht werden nicht mitgerissen. An der Scherebene lässt sich die Höhe des ζ – Potentials (Zeta-Potentials) bestimmen (Abbildung 2-4).

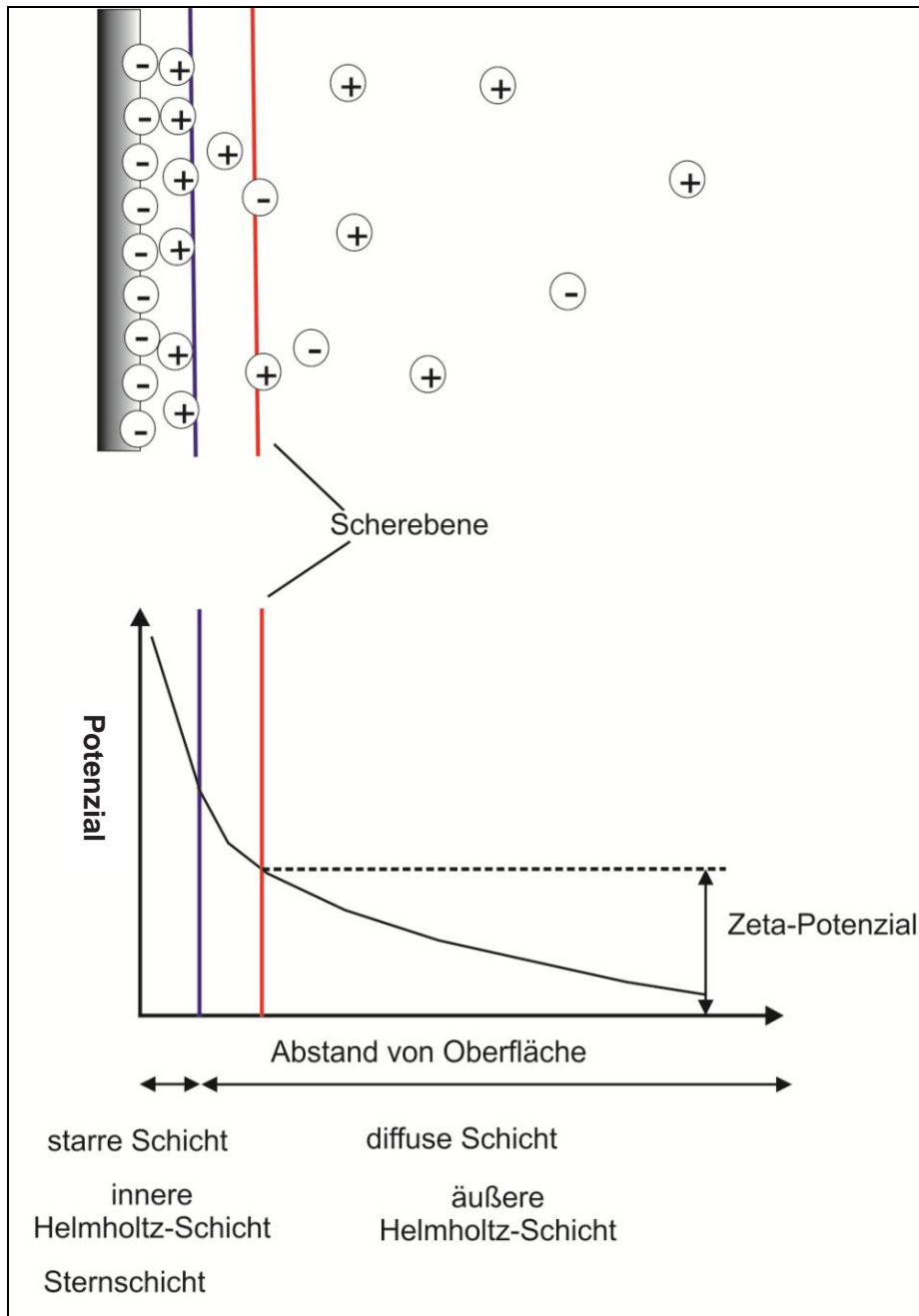


Abbildung 2-4: Aufbau und Potenzialverlauf einer elektrochemischen Doppelschicht.

Die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses (EOFs) wird nach Gleichung 15 berechnet.

$$v_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{(Gleichung 15)}$$

| | |
|------------------|---|
| v_{EOF} | Wanderungsgeschwindigkeit des EOFs [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| ε | Dielektrizitätspermeabilität [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| ζ | Zeta-Potenzial [V] |
| E | elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| η | dynamische Viskosität des Mediums [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$] |

Der EOF, der in der Gelelektrophorese Elektroendoosmose genannt wird, bezeichnet die Wanderung von Elektrolytteilchen und ihrer Hydrathüllen, die entgegengesetzt der Wanderungsrichtung der Probenpartikel verläuft. Im Beispiel der Agarosegele wandern hydratisierte Kationen in kathodischer Richtung. Dadurch sammelt sich an der Kathode Wasser an und die Anodenseite des Geles trocknet aus. Da dieser Effekt bei der Gelelektrophorese zu unerwünschten Verzerrungen und Verdünnungen der Probenzonen führt, werden bevorzugt ladungsfreie Trennmedien, wie Polyacrylamidgele oder ladungsarme Agarose verwendet [1].

2.1.3 Instrumenteller Aufbau der Gelelektrophorese

2.1.3.1 Spezielle Geräte

Für die Durchführung einer Gelelektrophorese werden 3 Geräte benötigt: elektrophoretische Kammer, Stromversorger und Kühlthermostat.

Die Elektrophoresekammer wird aus einem isolierenden Material wie Polycarbonat, PVC, Plexiglas, Keramik oder Glas hergestellt. In der Kammer wird die elektrophoretische Trennung durchgeführt. Als Elektrodenmaterial wird zumeist Platin, aber auch Graphit eingesetzt. Die Gelelektrophorese lässt sich in einer Horizontal- oder Vertikalkammer durchführen. Während für die Vertikalkammer sowohl Rund- (Abbildung

2-5 (A)) als auch Flachgele (Abbildung 2-5 (B)) geeignet sind, kommen in Horizontalkammern (Abbildung 2-6) nur Flachgele zum Einsatz [38].

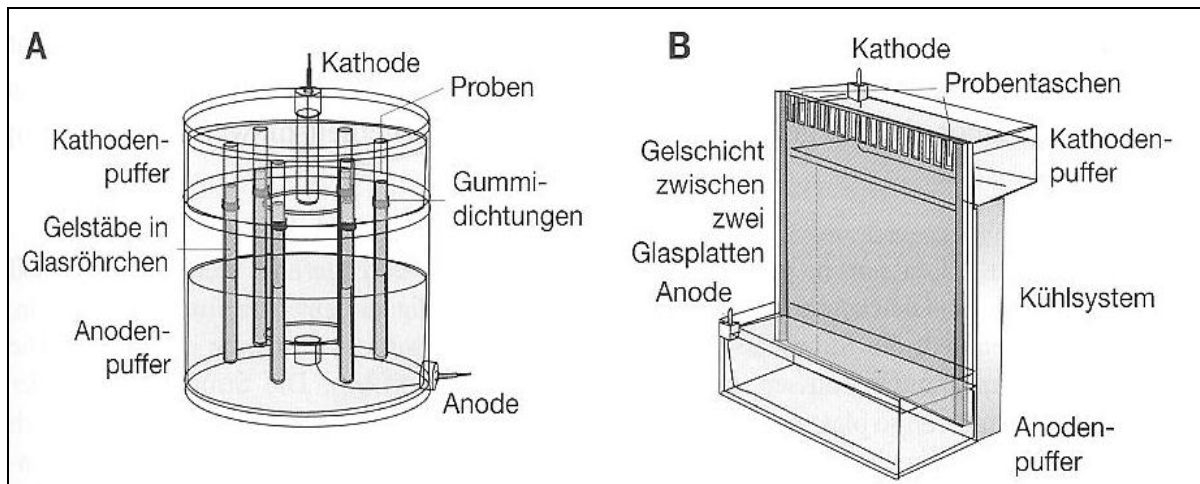


Abbildung 2-5: Schematischer Aufbau von vertikalen Gelelektrophoresekammern für (A) Rundgele und (B) Flachgele, aus [38].

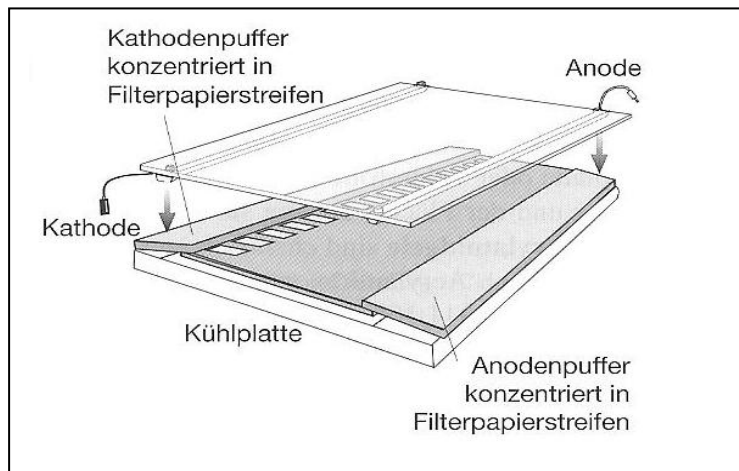


Abbildung 2-6: Horizontales Elektrophoresesystem. Meist werden Gele verwendet, die auf einer Trägerfolie stabilisiert sind. Die Elektroden werden von oben auf die Elektrodenstreifen aufgelegt, die mit konzentriertem Elektrodenpuffer getränkt sind, aus [38].

Bei der Elektrophorese in Vertikalsystemen werden die Gele in Glasröhrchen oder zwischen Glasplatten vollständig mit Pufferlösung umspült. Ein großer Vorteil ist der Einsatz dünnerer Gele. Durch die größere Oberfläche kann die Wärme, die sich während der Elektrophorese bildet, besser abgeführt werden. Daher kann mit höherer Spannung gearbeitet werden, die wiederum schärfere Banden und eine schnellere Auftrennung erlauben [62]. Die mit Glycerin beschwerte Probe wird mit einer Spritze oder Mikropipette unter den Kathodenpuffer unterschichtet. Die Auftragung erfolgt bei Flachgelen in Geltaschen, die bei der Gelherstellung mittels eines Kamms erzeugt werden, während die Probe bei den Rundgelen direkt in das Glasröhrchen eingebracht wird.

Bei einem Horizontalgelelektrophoresesystem (Abbildung 2-6) wird die Probe entweder direkt in Probewannen, die in das Gel eingegossen werden, pipettiert oder über Papierbrücken aufgetragen. Der elektrophoretische Lauf erfolgt mit puffergetränkten Elektrodenstreifen oder Elektrodenpuffer. Vorteil der Horizontalkammer ist ihre Vielseitigkeit, es können für eine Apparatur Gele unterschiedlicher Größe verwendet werden. Es werden zumeist Gele verwendet, die auf eine inerte Folie gegossen werden.

Die Elektrophorese ist die Trennung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Das elektrische Feld wird durch seine Feldstärke E ausgedrückt und lässt sich direkt über die Spannung einstellen (Gleichung 7). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen ist die Konstanz der erbrachten Spannung und der Stromstärke von höchster Bedeutung. Zu erfüllende Spezifikationen sind Gleichspannungen von 50 V bis 5000 V und Stromstärken von 5 mA bis 100 mA [1].

Schwankende Temperaturen wirken sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse aus. Die während der Gelelektrophorese erzeugte elektrische Energie wird teilweise in joulesche Wärme (Gleichung 16) umgewandelt, daher ist eine Kühlung des Systems vor allem bei langen Läufen (über Stunden) und dicken Gelen (ab 1,5 mm) unverzichtbar [38].

$$J = \frac{P}{V} = \frac{U \cdot I}{V} = \frac{R \cdot I^2}{V} \quad \text{(Gleichung 16)}$$

| | |
|---|--------------------------------------|
| J | Joulesche Wärme [W·m ⁻³] |
| P | elektrische Leistung [W] |
| V | Volumen [m ³] |
| U | elektrische Spannung [V] |
| I | elektrische Stromstärke [A] |
| R | elektrischer Widerstand [Ω] |

Der elektrophoretische Lauf wird meistens bei 10 – 15 °C durchgeführt. Thermostate regeln die Temperatur einer Kühlflüssigkeit bis zum gewünschten Wert. Danach wird diese Flüssigkeit in Kühlspiralen, welche die Laufkammer durchziehen, gepumpt.

2.1.3.2 Häufig verwendete Träger für die Elektrophorese

Als Träger für die Elektrophorese sind Papier, Acetylcellulose-Folien, Stärke-, Agarose- und Polyacrylamid-Gele bekannt. Vor allem haben sich die Agarose- und Polyacrylamidgele in der Elektrophorese durchgesetzt. Sie werden als Flach- oder Rundgele mit nicht-restriktiven (Trennung nur nach Ladung) und restriktiven Eigenschaften (Trennung nach Ladung und Masse) eingesetzt.

In der Gelelektrophorese kommen kommerzielle Fertiggele und selbstgegossene Gele zum Einsatz. Es gibt homogene Gele und Gradientengele, die man durch die kontinuierliche Veränderung der Monomerkonzentration in der Gellösung erhält. Das Gelnetzwerk wird in Richtung der Anode immer engmaschiger. Der stärkere Siebefeekt ermöglicht eine höhere Auflösung der Trennung.

Nicht-restriktiv wirken Agarosegele, sie sind untoxisch und für die Trennung großer Proteine über 500 kDa und Nukleinsäuren ideal geeignet, weil sie relativ große Poren besitzen. Die Porengröße von 1 % (g/ml) Agarosegel beträgt 150 nm, von 0,16 % (g/ml) ca. 500 nm. Gebräuchlich sind Gelkonzentrationen von 0,05 – 2,0 % [1].

Agarose wird nach Entfernung des Agaropektins aus dem Agar von roten Meeresalgen gewonnen und ist aus Polysaccharidketten aufgebaut, die sich jeweils aus etwa 400 Resten des Agarobiose-Monomers zusammensetzen [38]. Löst man Agarose in 90 – 100 °C heißem Wasser, bildet sich nach Abkühlen auf etwa 40 °C das Gel. Die Polysaccharidketten formen Doppelhelices, die sich zu Fäden zusammenlagern und Poren bilden (Abbildung 2-7).

Ein großer Nachteil ist die Elektroosmose (Kapitel 2.1.2.2), die durch die sauren Gruppen (Sulfat, Carboxylgruppen etc.) der Agarose hervorgerufen wird. Mittlerweile sind ladungsmodifizierte Agarosesorten verfügbar. Der Grad der Elektroosmose (m_r -Wert) und die Schmelztemperatur sind charakteristische Größen der Agarosesorten.

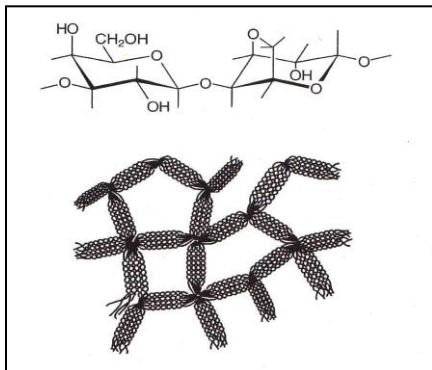


Abbildung 2-7: Agarobiose-Ketten, Gelstruktur der Agarosegele, aus [38].

Ein weiterer häufig verwendeter Träger ist das Polyacrylamidgel, das ein Polymerisationsprodukt aus dem Monomer Acrylamid und dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) ist. Weitere Bestandteile zur Gelherstellung sind das N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter (Abbildung 2-8). Die Vorteile der Polyacrylamidgele sind die chemische Stabilität und die geringe Elektroendoosmose, weil sie frei von Ladungen sind.

Sauerstoff und Peroxid stören den Polymerisationsprozess als Radikalfänger. Daher sollte der Polymerisationsprozess möglichst unter Luftausschluss geschehen. Andere Faktoren, die bei der Gelherstellung berücksichtigt werden müssen, sind der pH-Wert, die Temperatur und die Qualität der Chemikalien.

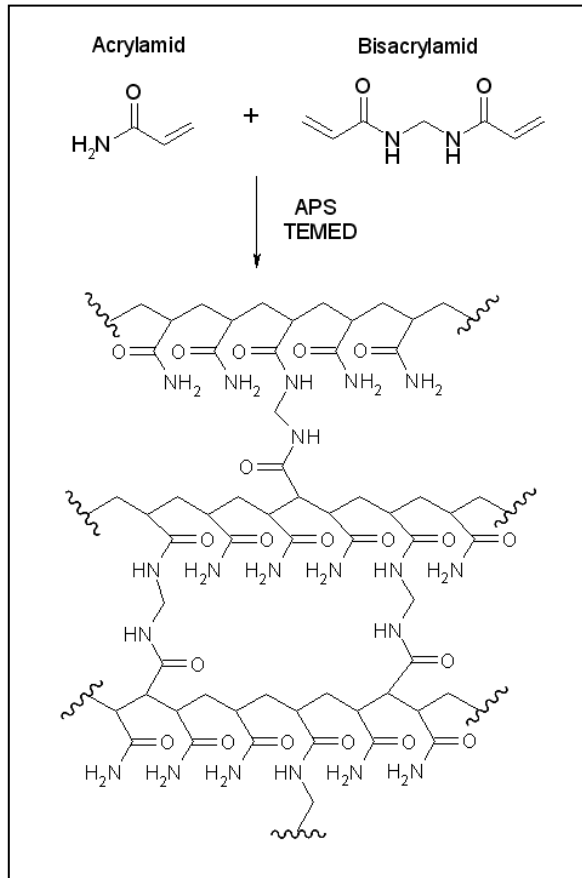


Abbildung 2-8: Die Gelstruktur des Polyacrylamidgels als Polymerisationsprodukt aus Acrylamid und Bisacrylamid, aus [38].

Die Porengröße des Gels wird durch die Total-Monomerkonzentration T' (Gleichung 17) und dem Vernetzungsgrad C (Engl.: crosslinking) bestimmt (Gleichung 18) [63, 64].

$$T' = \frac{(a+b) \cdot 100}{V} \quad \text{(Gleichung 17)}$$

| | |
|------|--------------------------------------|
| T' | Totalmonomerkonzentration [% (g/ml)] |
| a | Masse vom Acrylamid [g] |
| b | Masse vom Quervernetzer [g] |
| V | Volumen einer Lösung [ml] |

$$C = \frac{b \cdot 100}{a + b} \quad \text{(Gleichung 18)}$$

| | |
|---|-----------------------------|
| C | Vernetzungsgrad [% (g/g)] |
| a | Masse vom Acrylamid [g] |
| b | Masse vom Quervernetzer [g] |

Gele mit niedrigen Polyacrylamidkonzentrationen ($T' = 4 - 5 \%$, $C = 3 \%$) wirken nicht restriktiv. Ab einer Gesamtkonzentration von $T' = 7 - 20 \%$, bei $C = 5 \%$ nimmt die restriktive Wirkung zu. Allerdings ist die Erhöhung von C nur beschränkt möglich, Gele mit $C > 5 \%$ werden spröde und hydrophob. Die Porengröße eines Polyacrylamidgels mit 5% T' und 3% C beträgt $5,3 \text{ nm}$, das eines Gels mit 20% T' und 3% C $3,3 \text{ nm}$ [38]. Nachteile der Polyacrylamidgele ist die Neurotoxizität des Acrylamidmonomers [65] und BIS. Außerdem sind sie nicht zur Trennung von Proteinen $> 800 \text{ kDa}$ geeignet [38].

2.1.4 Verschiedene Trenntechniken der Gelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese wurde bereits in den Dreißigerjahren von Tiselius in Form der Serumprotein-Elektrophorese erfunden, welche dann zur Zonenelektrophorese weiterentwickelt wurde [38]. Weitere Meilensteine setzten Raymond mit der Erfindung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) 1959 und Hjertén mit der Agaroseelektrophorese. Die von Ornstein und Davis 1964 eingeführte Technik der diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-Elektrophorese) findet auch heute noch verbreitet Einsatz in der Erforschung von Proteinen und biologischen Proben (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Übersicht über die elektrophoretischen Methoden.

| Elektrophoretische Methode | Puffer / elektrische Feldstärke | pH-Wert |
|-----------------------------------|--|----------------|
| Zonenelektrophorese | konstant | konstant |
| Isotachophorese | 2 oder mehrere | 2 oder mehrere |
| Isoelektrische Fokussierung | variabel | Gradient |

Eingesetzt werden vor allem Kombinationen aus elektrophoretischen Methoden, wie die SDS-Disk-Elektrophorese (Kapitel 2.1.4.1.B) oder die zweidimensionale Gelelektrophorese in Form von IEF-SDS-Disk-Elektrophorese (Kapitel 2.1.4.1.D).

2.1.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese (1-DE)

2.1.4.1.A Disk-Elektrophorese nach Ornstein und Davis

Die Disk-Elektrophorese ist eine Kombination aus Isotachophorese und der Zonenelektrophorese. Der im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau-Farbstoff dient als Marker der Laufront, um den Verlauf der Gelelektrophorese zu kontrollieren. Sobald die Bromphenolblau-Bande das Gelende erreicht, wird der Lauf beendet.

Die Trennung anionischer Proteine mit der Disk-Elektrophorese nach Ornstein [66] und Davis [67] erfolgt in einem Puffer-Gel-System, das sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzt, die Unterschiede in der Gelporengröße (Acrylamidkonzentration) und in der Pufferzusammensetzung (pH, Ionenstärke, Ionenart) aufweisen [68].

Für die Disk-Elektrophorese wird häufig das TRIS-Chlorid-Glycinat-Puffersystem eingesetzt [1] (Abbildung 2-9). Die Trennung im großporigen Sammelgel erfolgt nach dem Prinzip der Isotachophorese mit den Chlorid-Ionen als Leitionen mit höchster elektrophoretischer Mobilität und den Glycin-Ionen als Folgeionen mit niedrigster Mobilität. Das TRIS-Ion dient als Gegenion zur Pufferung des pH-Wertes. Im Sam-

melgel (pH: 6,8) liegt das Glycin (pKs: 6,0) als schwach geladenes Anion vor. Nach angelegter Spannung wandern die Proteine zwischen dem Chloridion als Leition und dem Glycinat als Folgeion mit der gleichen Geschwindigkeit bis zur Grenze von Sammel- und Trenngel (Gleichung 19, Abbildung 2-9). Dies erfolgt in einer Stapelform anhand ihrer Mobilitäten nach dem Kohlrausch'schen Gesetz (Gleichung 20) [69].

$$v = E_L \cdot \mu_L = E_F \cdot \mu_F \quad \text{(Gleichung 19)}$$

| | |
|---------|---|
| v | Wanderungsgeschwindigkeit [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| E | Elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] |
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| L | Leition |
| F | Folgeion |

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{\mu_1}{\mu_1 + \mu_G} \cdot \frac{\mu_2 + \mu_G}{\mu_2} \cdot \frac{|z_1|}{|z_2|} \quad \text{(Gleichung 20)}$$

| | |
|---------|---|
| c_i | Konzentration der i-ten Komponente [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| μ_i | elektrophoretische Mobilität eines Teilchens [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
| z | Betrag der Ionenladung |
| G | Gegenion |

Am engporigen Trenngel wird ein Proteinstapel aufgestaut. Das niedermolekulare Glycinat-Ion kann dagegen ungehindert in das Trenngel eindringen und überholt die Proteine, so dass die Aufkonzentrierung der Proteinprobe zusätzlich verstärkt wird. Dieser Konzentrationseffekt ist auch unter Stacking-Effekt oder Stapel-Effekt bekannt. Im kleinporigen Trenngel werden die Proteine nach dem Prinzip der Zonenelektrophorese nach ihrer Mobilität und Größe getrennt.

Im Vergleich zur reinen Zonenelektrophorese sind die Analysenzeiten der Disk-Gelelektrophorese kürzer [67]. Dadurch kann eine Verbesserung der Auflösung erzielt werden. Des Weiteren treffen die Proteine nicht sofort auf das engporige

2.Theoretischer Teil

Trenngel, wodurch eine Aggregation am Probenauftragsort vermieden wird. Für Proteine mit einem pI größer als 6,8 wird die Disk-Elektrophorese in einem sauren Puffer durchgeführt und die Proteine in kathodischer Richtung aufgetrennt.

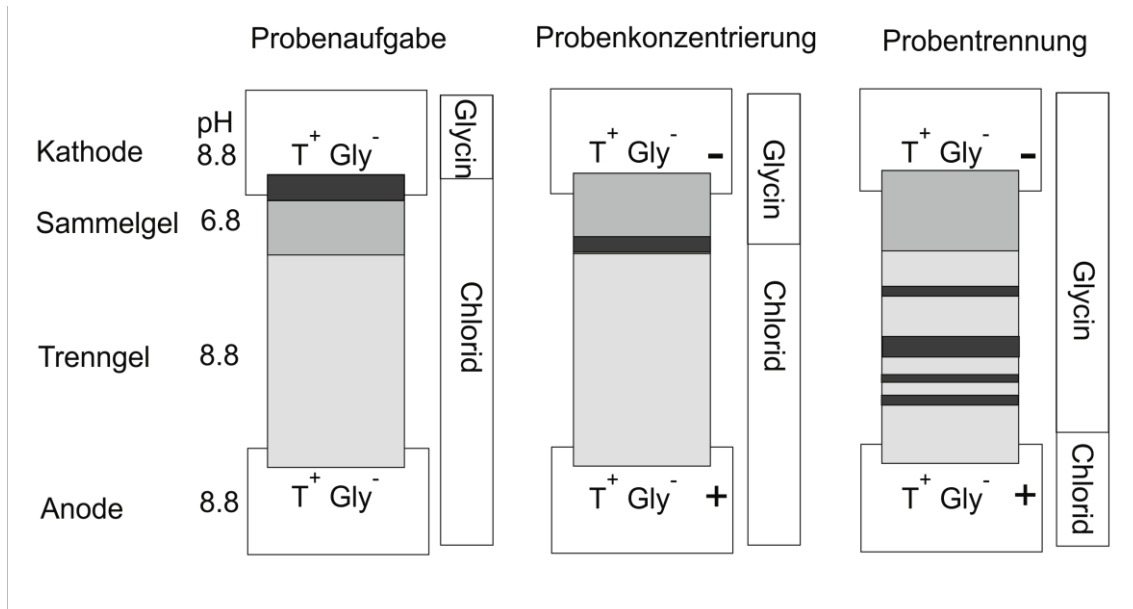


Abbildung 2-9: Trennprinzip der Disk-Elektrophorese mit einem TRIS-Chlorid-Glycinat-Puffersystem ($T^+ = \text{TRIS}$, $Gly^- = \text{Glycin}$).

Die Laufstrecke s eines Proteins in einem Gel ist von der Totalacrylamid-Konzentration T' abhängig. Die Berechnung der relativen Mobilität R_f erfolgt nach Gleichung 21, sie ist der Quotient der Wanderungsstrecke einer Bande s und der Wanderungsstrecke der Lauffront s_0 , die z. B. durch das Bromphenolblau angezeigt wird.

$$R_f = \frac{s}{s_0} \quad (\text{Gleichung 21})$$

R_f relative Mobilität

s Wanderungsstrecke eines Proteins [m]

s_0 Wanderungsstrecke einer Lauffront [m]

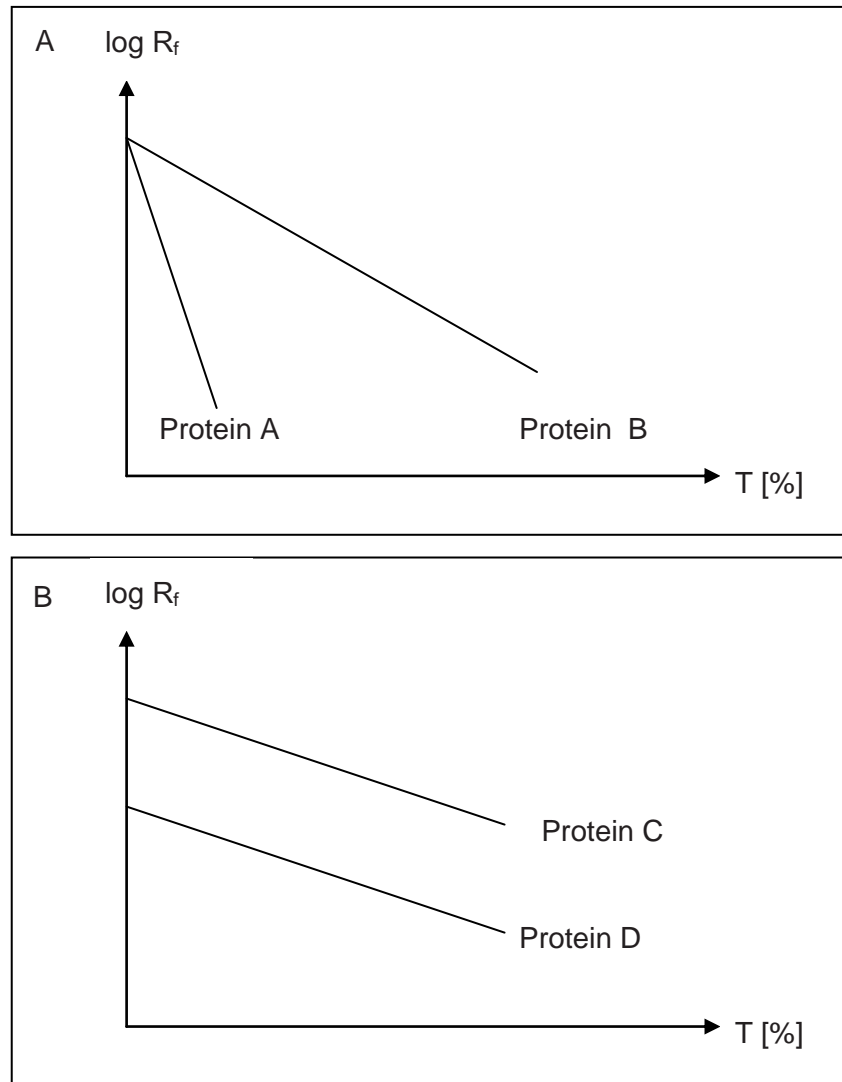


Abbildung 2-10: Ferguson Plots von 4 globulären Proteinen;

(A) Die Ferguson-Plots der Proteine A und B schneiden sich an der y-Achse und weisen unterschiedliche Steigungen auf, Protein A und B tragen die gleiche Ladung, $M_r(A) > M_r(B)$;

(B) Die Ferguson-Plots der Proteine C und D schneiden sich nicht und besitzen die gleiche Steigung, Protein C und D besitzen die gleiche Molekularmasse, aber Protein C weist eine stärkere Ladung als Protein D auf.

Variiert man T' im Trenngel (bei konstantem C) unter Beibehaltung sonstiger elektrophoretischer Bedingungen, wie die Verwendung identischer Puffer, gleicher Feldstärke und gleicher Temperatur, lassen sich Ferguson-Plots erstellen (Abbildung 2-10). Dabei werden die relativen Mobilitäten R_f eines Proteins logarithmisch über die Gelkonzentrationen T' aufgetragen. Sie zeigen die lineare Abhängigkeit des Logarithmus der relativen Mobilität R_f von der Totalkonzentration T' (Gleichung 22).

Die Steigung K_R , auch als Retardationskoeffizient bekannt, ist bei globulären Proteinen linear von dem Molekölradius r (Stokes Radius) [38] und folglich auch von der Molekülmasse M_r abhängig [70]. Darüber hinaus lässt sich die Ladung des Proteins über die Interpolation der Ferguson Plots auf $T' = 0$ ableiten.

$$\log R_f = - K_R \cdot T' + \log Y_0 \quad \text{(Gleichung 22)}$$

| | |
|-------|--|
| R_f | Relative Mobilität |
| K_R | Retardationskoeffizient |
| T' | Totalacrylamid-Konzentration |
| Y_0 | Relative Mobilität unabhängig der Matrix |

2.1.4.1.B SDS-Disk-Elektrophorese

Die am häufigsten eingesetzte Gelelektrophorese-Methode ist die SDS-Disk-Elektrophorese nach Laemmli [71]. Damit werden Proteine nur nach ihrer Molekülgröße getrennt. Vor der eigentlichen Trennung wird die Probe mit SDS und dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol [45] oder Dithiothreitol (DTT) einige Minuten bei 95 °C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erhalten.

Das in der Pufferlösung enthaltene Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS, Engl.: **sodium dodecylsulfate**) dient zur Denaturierung von Proteinen. Als Denaturierung versteht man die Überführung einer nativen Konformation in eine lösliche Zufallsknäuel-Konformation [1]. Durch die Einwirkung von SDS werden stab- bzw. kugelförmige SDS-Protein-Komplexe gebildet, die negative Gesamtladungen tragen.

Die SDS-Moleküle bestehen aus einem großen hydrophoben Teil (Schwanz) und einem kleinen hydrophilen Teil (Kopf). In der Komplexverbindung mit dem Protein ist der Schwanzteil dem Protein zugewandt, während der Kopf mit Wassermolekülen Wechselwirkungen zeigt. So werden sowohl die inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen als auch die unpolaren Wechselwirkungen des Proteins unterbunden. Dadurch werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst und das Protein nimmt mit den SDS-Ionen eine ellipsoide Struktur an.

Ein großer Vorteil des SDS ist sein konstantes Bindungsverhältnis zum Protein, ca. 1,4 g SDS pro g Protein bzw. ein SDS-Molekül auf zwei Aminosäuren werden gebunden [72]. Da die Eigenladung des Proteins durch die vielen SDS-Ionen überdeckt wird, können Proteine allein anhand ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden.

Durch das β -Mercaptoethanol, DTT oder andere Reduktionsmittel werden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteingruppen des Proteins gespalten und somit die Sekundärstruktur aufgelöst. Die relative Wanderungsstrecke des SDS-Protein-Komplexes ist von der Molekularmasse abhängig. Innerhalb des linearen Bereiches der Trennstrecke, der von der Art des Geles bestimmt wird, lässt sich mit Protein-standards mit bekannten Molekularmassen die Molekularmasse eines unbekannten Proteins abschätzen (Abbildung 2-11).

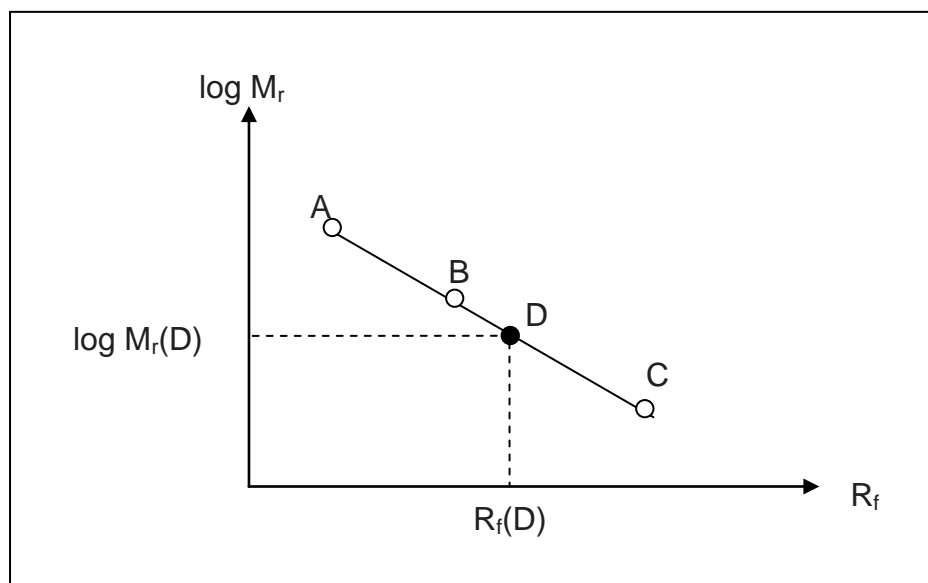


Abbildung 2-11: Schema zur Bestimmung der relativen Molekularmasse (M_r) des Proteins D anhand der Standardproteine A, B und C mit bekannter M_r .

Für Glykoproteine werden borathaltige Puffersysteme (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) verwendet, weil die unter den Versuchsbedingungen negativ geladenen Zuckerketten nur schwer SDS binden. Für die Trennung stark saurer Proteine wird das SDS durch Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ersetzt und die Elektrophorese bei saurem pH-Wert (3,5 – 5) betrieben.

2.1.4.1.C Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Peptide und Proteine verhalten sich in Lösung amphoter, ihre Aminosäurereste, aus denen sie sich zusammensetzen, besitzen saure und basische Gruppen, die je nach pH-Wert der Umgebung Protonen abgeben bzw. aufnehmen können. Die absolute Gesamtladung eines Proteins ergibt sich aus der Summe aller positiven und negativen Ladungen der Aminosäurereste. Die effektive Gesamtladung des Proteins, auch Nettoladung genannt, ist meistens kleiner als die absolute Gesamtladung, weil sich Gegenionen abhängig von der Ionenstärke des Puffers an das Protein anlagern können [1].

Der pH-Wert, bei dem sich die Zahl der positiven und negativen Ladungen ausgleicht, also die Nettoladung null ist, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Neben der Molekularmasse ist dieser eine weitere charakteristische physikalische Größe eines Proteins. Rund 95 % aller Proteine besitzen pIs zwischen pH 3 und pH 10. Diese können durch Phosphorylierung, Glykosylierung, Oxidationen und die dreidimensionale Konformation des Proteins beeinflusst werden [38].

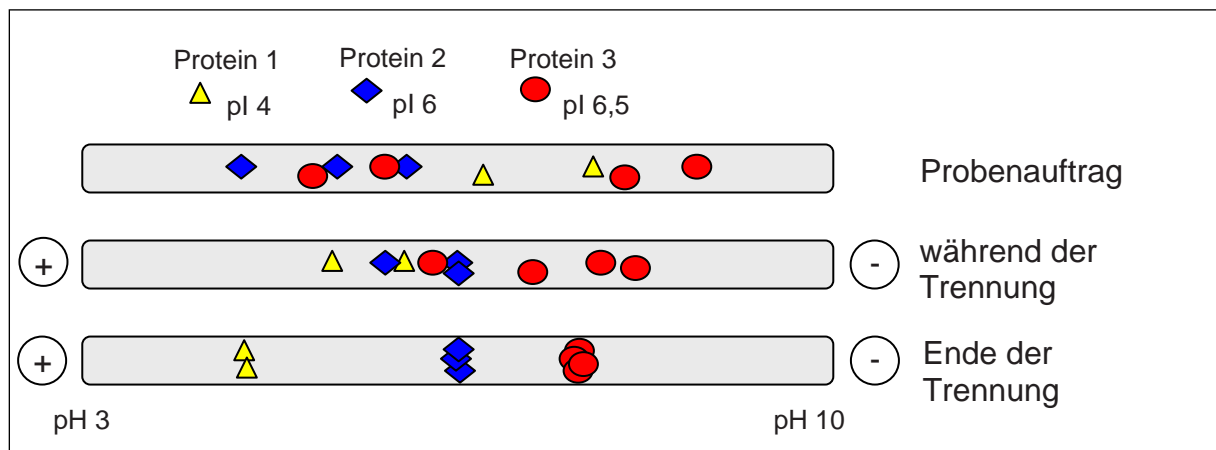


Abbildung 2-12: Prinzip der isoelektrischen Fokussierung anhand einer Probe bestehend aus 3 Proteinen mit unterschiedlichen pI. Nach Anlegen einer Spannung wandern Proteine anhand ihres pI zu dem Punkt des Gels, dessen pH-Wert ihrem jeweiligen pI entspricht. Dort werden die Proteine durch das elektrische Feld fokussiert.

Proteingemische lassen sich durch die IEF unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einem pH Gradienten anhand ihrer pIs auftrennen [38, 73]. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern Proteine abhängig von ihrer Nettoladung zur Anode (Pluspol) oder zur Kathode (Minuspole). Im pH-Gradienten wandert ein Protein mit einer negativen Gesamtladung in Richtung der Anode (Abbildung 2-12). Währenddessen nimmt der pH-Wert der Umgebung ab und das Protein verliert allmählich seine negativen Ladungen. Erreicht es den pH-Wert im Gradienten, bei dem die Anzahl seiner negativen Ladungen der Anzahl seiner positiven Ladungen entspricht, hört das Protein auf zu wandern und wird bei diesem pH-Wert, seinem pI, stationär.

Am pH-Wert des pIs zeigen Proteine ihre schlechteste Löslichkeit. Daher kann es zu Präzipitationen kommen. Wandert das Protein zu weit in die Richtung der Anode, d. h. überschreitet es seinen pI, wird das Protein positiv aufgeladen und es wandert wieder in Richtung der Kathode (Minuspole) zu seinem pI (Abbildung 2-12).

Im Gegensatz zu den in Kapitel 2.1.4.1.A und B beschriebenen Verfahren ist die IEF eine Endpunktmethode mit einem zeitunabhängigen Trennergebnis [74]. Es wird ein Äquilibrium zwischen dem elektrischen Massentransport und der Diffusion eingestellt.

Der pH-Gradient wird entweder aus mobilen Trägerampholyten gebildet oder liegt in einer Gelmatrix fest polymerisiert vor (immobilisierter pH-Gradient, IPG). Die Trägerampholyte sind ein heterogenes Gemisch niedermolekularer ($M_r < 1000$ Da) aliphatischer Oligoamino- und Oligocarbonsäuren mit eng beieinander liegenden pIs zwischen pH 2,5 und pH 11 [73]. Nach Erzeugung eines elektrischen Feldes wandern die Trägerampholyte zu ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt, d. h. das Teilchen mit dem höchsten pI wandert zur Kathode (Minuspole) und das Teilchen mit dem niedrigsten pI zur Anode. Entsprechend ihrer pIs positionieren sich die restlichen Ampholyte im Gel und erzeugen so einen pH-Gradienten [75]. Je nach Zusammenstellung der Trägerampholyte können unterschiedliche pH-Gradienten erhalten werden. Ein großes Problem der Trägerampholyte stellt der Kathodendrift dar. Mit der Zeit tritt Elektrosmose auf, die an der Kathodenseite am stärksten ausgeprägt ist, dadurch werden basische Proteine nicht mehr erfassbar.

Die zweite Methode ist der Einsatz von Immobilen. Immobiline sind Acrylamidderivate, die direkt in die Gelmatrix einpolymerisiert werden (Abbildung 2-13). Sie besitzen die Struktur $\text{CH}_2 = \text{CHCO-NH-R}$, bei der R entweder eine Carboxyl- oder eine tertiäre Aminogruppe repräsentiert. Ähnlich wie bei den Trägerampholyten lässt sich der pH-Gradient jeweils aus dem Mischungsverhältnis von den jeweiligen Immobilen erzeugen. So können Gele mit sehr weiten oder engen, linearen und nicht-linearen pH-Intervallen hergestellt werden.

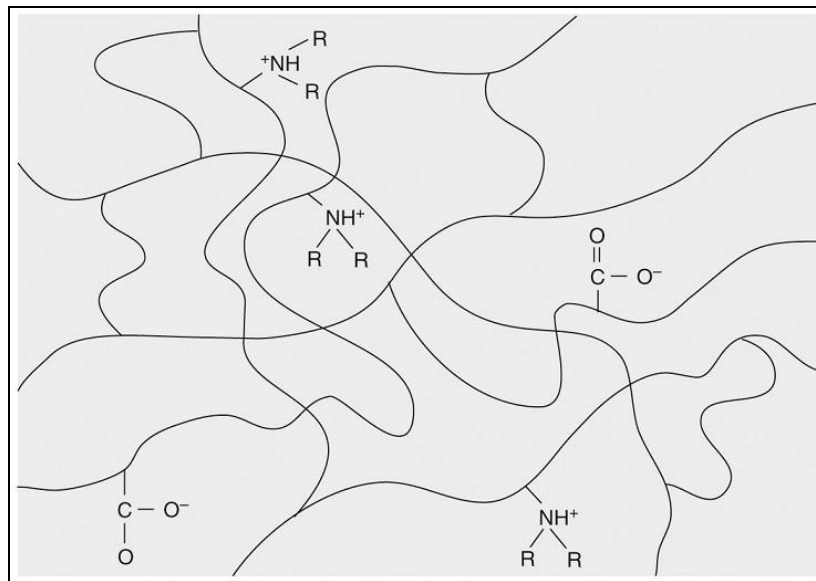


Abbildung 2-13: Schematische Darstellung eines Polyacrylamidgels mit einpolymerisierten Immobilen, aus [38].

Die IPGs, die von Gasparic et al. [1] entwickelt wurden, ist den mobilen Trägerampholyten aufgrund ihrer höheren Stabilität gegen Elektroosmose überlegen. Sie weisen eine homogene Leitfähigkeit und Pufferkapazität entlang des Gels auf. Die im Betrag geringere Leitfähigkeit ermöglicht auch bei Einsatz hoher Spannung eine relativ geringe Erwärmung. Somit konnte die Auflösung von 0,02 pH-Einheiten/cm auf 0,001 pH-Einheiten/cm verbessert werden [76].

Die Auflösung der IEF, die die kleinste erforderliche pI-Differenz darstellt, um zwei Banden voneinander zu unterscheiden, lässt sich nach Gleichung 23 berechnen [1]:

$$\Delta pI = 3,07 \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[-d\mu/d(pH)]}} \quad \text{(Gleichung 23)}$$

| | |
|--------------|---|
| ΔpI | Auflösung |
| D | Diffusionskoeffizient [$m^2 \cdot s^{-1}$] |
| E | elektrische Feldstärke [$V \cdot m^{-1}$] |
| $d(pH)/dx$ | pH-Gradient [m^{-1}] |
| $d\mu/d(pH)$ | Mobilitätssteigerung des Proteins am pI [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$] |

Demnach erreicht man eine höhere Auflösung entweder durch einen engeren pH-Gradienten oder durch eine höhere elektrische Feldstärke, indem man eine höhere Spannung angelegt. Auch ein kleinerer Diffusionskoeffizient, d. h. niedrigere Temperatur und höhere Viskosität der Trennlösung (Gleichung 24) führt zu einem besseren Auflösungsvermögen.

$$D = \frac{k_b \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{(Gleichung 24)}$$

| | |
|--------|---|
| D | Diffusionskoeffizient [$m^2 \cdot s^{-1}$] |
| k_b | Boltzmann-Konstante [$J \cdot K^{-1}$] |
| T | Temperatur [K] |
| η | Viskosität eines Mediums [$N \cdot s \cdot m^{-2}$] |
| r | Radius eines Teilchens [m] |

2.1.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

Die klassische zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE), die Kombination von IEF mit SDS-PAGE, wurde im Jahr 1975 unabhängig voneinander von O'Farrell [3] und Klose [4] entwickelt. Bis heute ist sie das Arbeitspferd für die Proteomforschung [5, 77], weil sie die Auftrennung von Tausenden Proteinen auf einem Gel ermöglicht [78]. In der ersten Dimension werden die Proteine anhand ihrer pIs und in der anschließenden zweiten Dimension anhand ihrer Molekularmassen (Abbildung 2-14) getrennt.

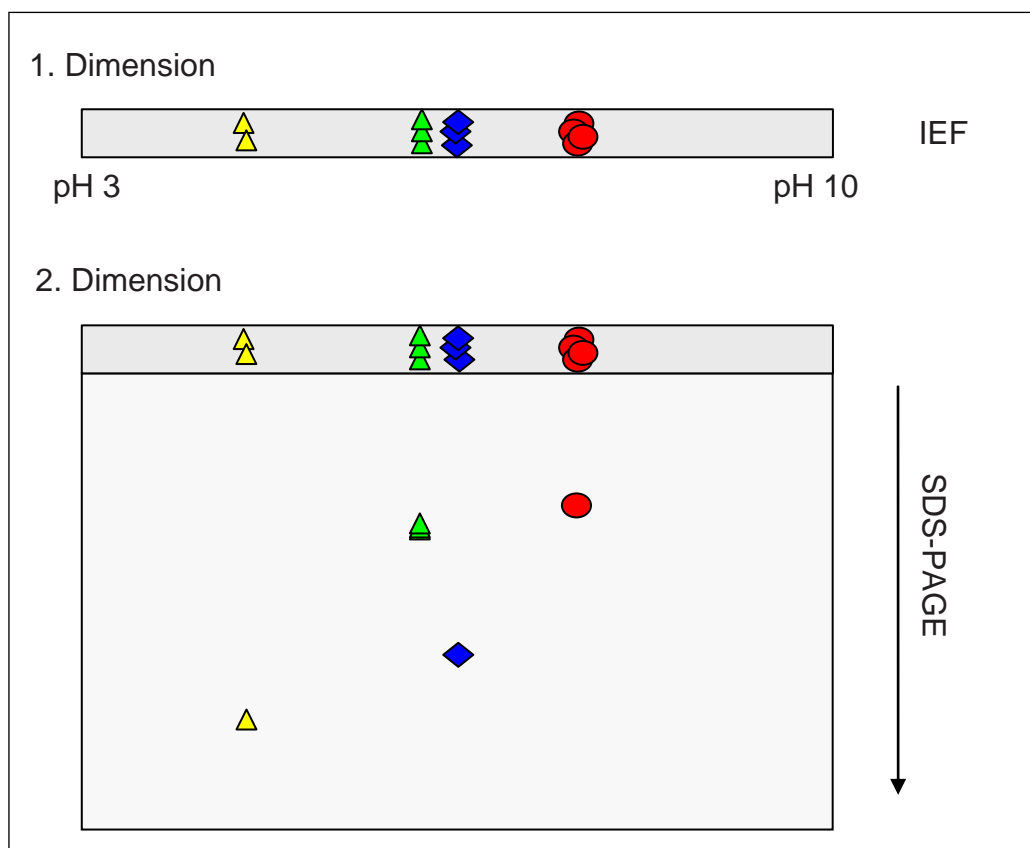


Abbildung 2-14: Prinzip der 2-D-Gelelektrophorese IEF-SDS-PAGE

Für die erste Dimension der IEF wurden ursprünglich Rundgele verwendet, die einen pH-Gradienten enthielten, der mittels von freien Trägerampholyten erzeugt wurde. Nach der Entwicklung der IPG-Streifen (Kapitel 2.1.4.1.C) für die IEF wurden diese von den Flachgelen aufgrund der besseren Handhabung beinahe vollständig ersetzt [5]. Ein 2-D Trennsystem, das noch mit Rundgelen arbeitet, ist die hochauflösende 2-D NEPHGE (Engl.: Non equilibrium pH gel electrophoresis) nach Klose [4].

Aufgrund der komplizierten Herstellung werden für die IEF meistens Fertiggele verwendet, die bereits auf einer Plastik-Trägerfolie getrocknet und in dünne Streifen geschnitten sind. Je nach Anforderung stehen diverse pH-Bereiche unterschiedlicher Trennlängen mit linearen oder nicht-linearen Gradienten zur Verfügung. Diese müssen lediglich vor Verwendung mit einem Rehydratationspuffer aufgequollen werden [5].

Der Rehydratationspuffer, auch Quellpuffer genannt, enthält neben Harnstoff nichtionische oder zwitterionische Detergenzien, die zum Lösen der Proteine dienen, sowie Reduktionsmittel und Ampholyte. Für hydrophobe Proteine kann ein Teil des Harnstoffs durch Thioharnstoff ersetzt werden [79].

Es gibt drei verschiedene Arten die Probe auf die IPGs zu bringen, Cup-loading und aktive bzw. passive In-Gel-Rehydratisierung. Beim Cup-loading wird der IPG-Streifen zunächst nur mit dem Rehydrationspuffer aufgequollen. Dann erfolgt erst die Probenaufgabe mittels eines Probenauftragstrichters oder einer Papierbrücke an einen bestimmten pH-Wert, der sich meistens in der Nähe der Extremen befindet. Ist der IPG-Streifen mit einer Rehydratisierungslösung, die die Probe schon enthält, aufgequollen worden, nennt man das Verfahren In-Gel-Rehydratisierung. Dieses Verfahren wird weiterhin in aktive, d. h. Rehydratisierung unter Anlegen einer Spannung, und passive In-Gel-Rehydratisierung, also ohne Spannung, untergliedert [80]. Für hydrophobe oder sehr alkalische Proteine empfiehlt sich das Cup-Loading, bei semi-präparativen Analysen die In-Gel-Rehydratisierung, weil ein größeres Volumen aufgetragen werden kann [76].

Abhängig vom pH-Intervall und der Länge der Streifen gibt es unterschiedliche Protokolle für den IEF-Lauf. Anfangs wird eine sehr niedrige Spannung angelegt und folglich niedrige Feldstärke erzeugt, um Proteinausfällungen an der Geloberfläche zu vermeiden. Danach wird die Spannung schrittweise bis zu mehrere Tausend Volt gesteigert [38]. Die IEF findet unter Kühlung statt und es wird eine Obergrenze für die Stromstärke im μA -Bereich gesetzt.

Als Träger für IPGs kommen allein Polyacrylamidgele in Frage, in der Regel T = 5 % und C = 3 %. Für Proteine mit einer Masse von mehr als 500 kDa, muss auf die IEF mit Trägerampholyten im Agarosegel zurückgegriffen werden.

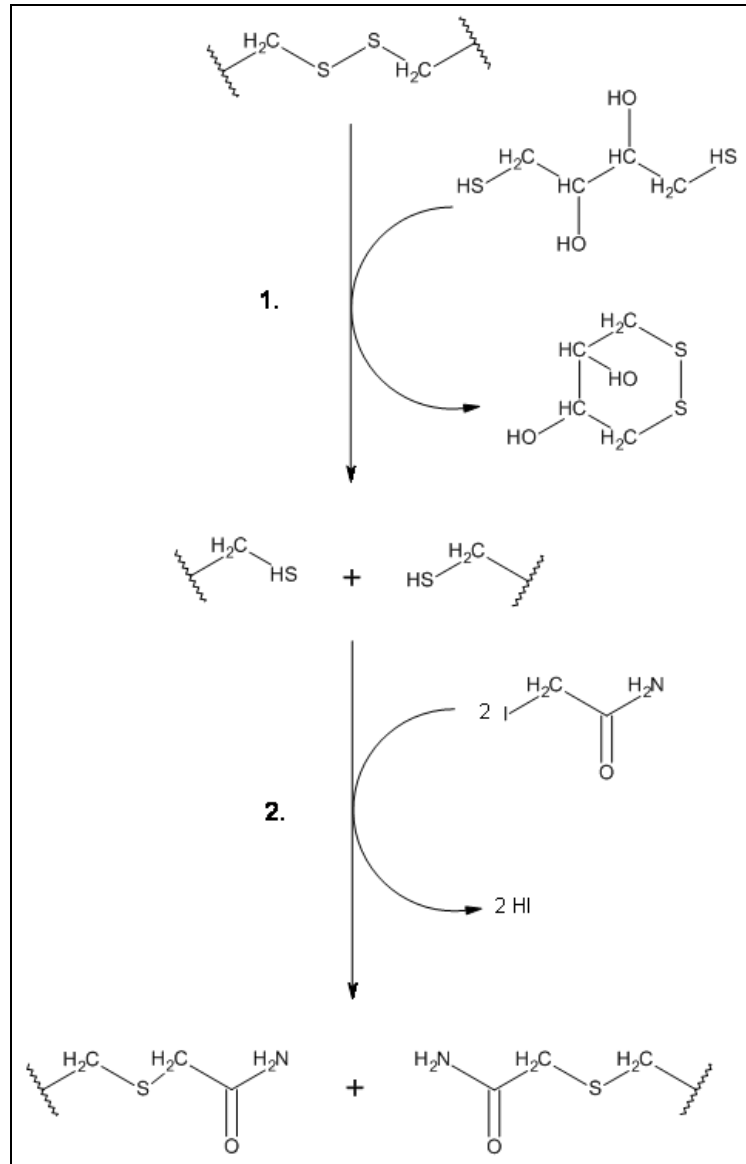


Abbildung 2-15: Äquilibration nach der ersten Dimension der 2-DE, (1) die Proteine werden zunächst mit Dithiothreitol reduziert und (2) anschließend mit Iodacetamid alkyliert.

Nach der IEF werden die Proteine in einer Zwei-Schritt-Prozedur (Abbildung 2-15) für den Dimensionstransfer auf die 2. Dimension, die SDS-PAGE, vorbereitet. Sie werden in einer SDS-haltigen Äquilibratorlösung inkubiert, damit die Proteine möglichst vollständig in das SDS-Gel übergehen [76]. Weitere Zusätze sind Harnstoff und Glycerol, die die Elektroendoosmose des geladenen IPG-Gels unterdrücken sollen, und TRIS-HCl-Puffer, der auch in den SDS-PAGE-Gelen enthalten ist.

Zunächst erfolgt ein Äquilibrationsschritt mit einem Reduktionsmittel, z. B. Dithiothreitol (DTT), um Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu spalten. Danach wird der IPG-Streifen in eine neue Äquilibratorlösung überführt, die statt des DTTs Iodacetamid enthält. Das Iodacetamid dient zur Alkylierung der freien Sulfhydrylgruppen der Proteine und verhindert damit mögliche Reoxidationen und Artefaktbildungen nach der Trennung. Eine weitere Aufgabe des Iodacetamids besteht in der Oxidation des überschüssigen DTTs, das sonst vertikale Streifungen auf dem Gel verursacht, weil es bei dem basischen pH-Milieu als Anion vorliegt [76].

Nach der Äquilibration wird der IPG-Streifen auf die Oberfläche des SDS-PAGE-Gels gebracht und im vertikalen System zusätzlich durch Agarose-Lösung fixiert [38]. Der Lauf der 2. Dimension findet ebenfalls unter Kühlung statt, um kontrollierte Versuchsbedingungen zu erzielen. Dabei können homogene Gele oder Gradientengele eingesetzt werden.

2.1.5 Färben und Detektieren

2.1.5.1 Färbe- und Markierungsmethoden

Da die meisten Proteine farblos sind, müssen diese sichtbar gemacht werden, um sie nach der Auftrennung im Gel zu lokalisieren [1]. Standardmäßig setzt sich ein Färbeprotokoll aus drei Teilen zusammen: I) Fixierung, II) Färbung und III) Entfärbung.

In den meisten Protokollen werden die Proteine vor oder während des Färbeprozesses im Gel fixiert, um die Diffusion innerhalb der Gelmatrix und aus dem Gel zu verhindern [81]. Durch den Zusatz eines Alkohols (Ethanol, Methanol) und einer Säure

(Essigsäure, Trichloressigsäure) werden sie denaturiert und im Gel ausgefällt. Ist eine Untersuchung der Proteine in ihrem nativen Zustand oder eine Elution vom Gel für weitere Versuche geplant, so sollen auf die Färbeprotokolle ohne Fixierung zurückgegriffen werden [82]. Mit Ausnahme der radioaktiven Markierung lassen alle anderen Methoden nur eine relative Quantifizierung zu, die Anfärbbarkeit variiert nämlich von Protein zu Protein.

2.1.5.1.A Organische Farbstoffe

Das populärste Färbeverfahren für Polyacrylamidgele ist aufgrund der einfachen Handhabung und der Kosteneffizienz die Färbung mit den Triphenylmethanfarbstoffen Coomassie Brilliant Blau (CBB) (Abbildung 2-16). Ursprünglich für die Textilindustrie entwickelt, werden diese Farbstoffe seit den 60er Jahren in der Proteinanalytik eingesetzt [83]. Zunächst kam das CBB R-250 (R = rötliche Farbnuance, 250 = Farbintensität) auf den Markt, dann das modifizierte CBB G-250 (G = grünliche Farbnuance). Die CBB-Färbung mit CBB R-250 ist zwar sensibler, aber aufgrund ihrer schlechteren Reproduzierbarkeit ist CBB G-250 für quantitative Analysen vorzuziehen [84].

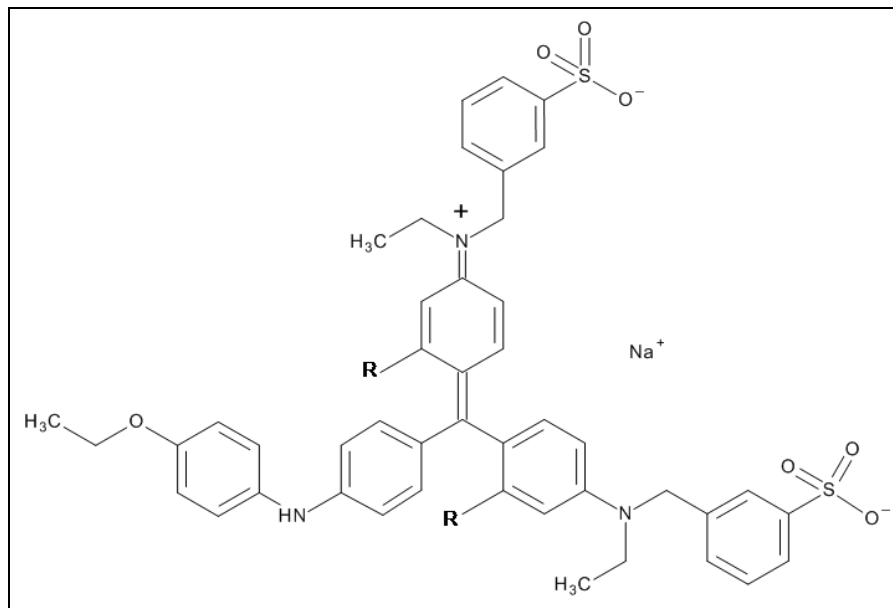


Abbildung 2-16: Strukturformel der Coomassie-Farbstoffe, R=H (CBB R-250) und R=CH₃ (CBB G-250).

Die klassische CBB-Färbelösung enthält ein organisches Lösungsmittel (Methanol oder Ethanol) und eine organische Säure (Essigsäure). Die Detektionsgrenze liegt bei 100 ng Protein [85]. Eine Alternative hierzu ist die kolloidale Coomassie-Färbung (Engl.: Colloidal Coomassie Blue, CCB). Dabei werden die Proteine in einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt, die durch Zusatz von Ammoniumsulfat und Phosphorsäure erhalten wird [84]. Diese Methode zeichnet sich durch eine niedrige Hintergrundfärbung und eine hohe Empfindlichkeit aus. Ihre Detektionsgrenze liegt bei 10 ng Protein [85]. Das Original-Protokoll von Neuhoff [84] wurde bereits häufig modifiziert [60, 86–88]. Die Konzentrationen des Farbstoffs und der Säure wurden erhöht [87]. Zudem wurde das toxische Methanol gegen Ethanol ausgetauscht [89]. Allerdings war eine längere Färbezeit erforderlich, um eine vollständige Färbung zu erzielen.

Kang et al. entwickelten die ungiftigere Variante weiter durch den Ersatz des Ammoniumsulfats durch Aluminiumsulfat und die Erhöhung der Phosphorsäurekonzentration, so dass bereits 2 ng Protein nach wenigen Stunden detektierbar war [90]. Das Aluminium-Kation verbessert die Färbung von Phosphoglykoproteinen als Brückenglied zwischen Farbstoff und Protein. Es koagulierte mit dem störenden SDS und erhöht damit die Sensitivität der CCB-Färbung [88].

Der neutralen Form des Coomassie-Moleküls wird die Proteinbindung zugeschrieben [88, 91]. Es bindet durch hydrophobe Wechselwirkungen an Aminosäurereste wie Phenylalanin, Tryptophan etc. und durch elektrostatische Interaktionen an Arginin, Lysin und Histidin.

Störungen treten durch SDS-Ionen, Trägerampholyte und andere Pufferionen, die auch mit dem Coomassie-Molekül interagieren können, auf. Daher ist ein intensiver Waschschrift vor dem Färben erforderlich [92]. Nachteile der Coomassie-Färbung ist ihr eingeschränkter linear dynamischer Bereich mit einem Faktor von 10 – 30 und die relativ hohe Detektionsgrenze [85]. Ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur densitometrischen Detektion mit Weißlicht bietet die VIS-NIR-Detektion [18, 21].

2.1.5.1.B Silberfärbung

Die Silberfärbung [85, 93–95] erfordert komplexere Arbeitsschritte als die CCB-Färbung. Der Vorteil ist ihre hohe Sensitivität, mit der 0,1 – 1 ng Protein pro Bande detektierbar ist [85].

Nach dem Fixieren, meist mit Trichloressigsäure, erfolgt der Sensibilisierungsschritt, d. h. zu dem Gel wird eine Silberionen-haltige Lösung gegeben. Die Silberionen benetzen die Oberfläche des Gels und an den Proteinbanden/ -spots werden diese zu elementarem Silber, den Silberkeimen, reduziert [1]. Erst durch die Entwicklungslösung, die als Reduktionsmittel Formaldehyd enthält, werden alle Silberionen auf dem Gel reduziert. In der Nähe der Silberkeime, die als Katalysatoren dienen, findet die Reduktion schneller statt. Damit nicht alle Silberionen reduziert werden und einen dunklen Gelhintergrund herbeiführen, wird die Reaktion mit Änderung des pH Wertes, z. B. durch Essigsäure oder Glycin, schnell gestoppt.

Die Methode erfordert eine höchste Reinheit der Reagenzien und Färbeutensilien, um Artefakte durch z. B. Hautproteine zu vermeiden. Neben dem unvorteilhaft engen linear-dynamischen Bereich von einer Dekade [96] und der proteinspezifischen

Anfärbung [75], bringt sie eine weitere Schwierigkeit mit sich. Die Silberfärbung ist keine Endpunkt-Färbung, d. h. die Farbintensität nimmt kontinuierlich mit der Zeit zu. Um mittels der Silberfärbung zu quantifizieren, müssen Zeitfenster sehr genau eingehalten werden oder mehrfach detektiert werden [97, 98].

2.1.5.1.C Fluoreszenzfärbung

Der bekannteste Fluoreszenzfarbstoff, ein Rutheniumkomplex mit dem Handelsnamen Sypro Ruby, verfügt über einen sehr breiten linearen Bereich von drei Dekaden und kann Proteinmengen von ca. 2 ng detektieren [85]. Er interagiert vor allem elektrostatisch mit den basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin [99] und ist für quantitative Zwecke sehr gut geeignet [85]. Da dieser Farbstoff sehr teuer und seine genaue Struktur geheim ist, wurde die preiswertere Alternative, die Ruthenium(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat)-Verbindung (RUBPS), entwickelt [100, 101], dessen Strukturformel öffentlich zugänglich ist. Diese universell einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffe sind mit phosphor- und glykoprotein-spezifischen Farbstoffen [102, 103] und der Massenspektrometrie (MS) [85, 104, 105] kombinierbar.

Vorteile der Fluoreszenzfärbung sind neben dem breiten linearen dynamischen Bereich die schnelle Entfärbung, die einfache Anwendbarkeit [101] und die gute MS-Kompatibilität [103]. Aufgrund der Photolabilität des Farbstoffes muss die Färbung und Entfärbung jedoch unter Lichtschutz durchgeführt werden [83]. Zur Auswertung sind teure Fluoreszenz-Imager erforderlich.

2.1.5.1.D Radioaktive Markierung

Die Radioaktive Markierung von Proteinen ist die sensitivste und die einzige absolut-quantitative Detektionsmethode für die Gelelektrophorese. Proteine lassen sich *in-vivo* oder *in-vitro* mit ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S und ^{125}I und anderen Isotopen radioaktiv markieren [75]. Die Detektion erfolgt z. B. durch Autoradiographie. Weitere Methoden sind die Fluorographie [1] oder die Detektion durch einen Phosphorimager [106, 107].

Bei der Autoradiographie wird ein Röntgenfilm einem Trenngel, das radioaktiv-markierte Proteine enthält, ausgesetzt. Die Proteine lassen sich anhand der Schwarzfärbungen auf dem Röntgenfilm nachweisen. Durch die radioaktive Strahlung (β -Strahlung, γ -Strahlung oder Röntgenstrahlung) entsteht metallisches Silber, das aus der Emulsion des fotografischen Films ausgefällt wird [75]. Zur Quantifizierung wurden die Schwärzungen ausgeschnitten und gewogen [1], heute werden die Röntgenfilme densitometrisch dokumentiert.

2.1.5.1.E Zink-Imidazol-Färbung

Die Zink-Imidazol-Färbung ist eine Negativ-Färbung, d. h. nicht die Proteine, sondern die Gelmatrix wird eingefärbt. Zunächst wird zu den Gelen nach der Elektrophorese eine Zinksalzlösung gegeben. Zinkionen binden sich an Histidin-, Cystein-, Glutamin- und Asparagin-Reste [103]. Wird eine Imidazol-Lösung hinzugefügt, bindet sich das Imidazol zunächst an ungebundene Zinkionen und es bildet sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion der bereits an die Proteine gebundenen Zinkionen ist langsamer, daher bleiben die Proteinspots klar [85]. Mit EDTA lässt sich die komplette Färbung rückgängig machen, die Proteine können weiter mit MS oder anderen enzymatischen Methoden untersucht werden. Die Detektionsgrenze liegt bei 10 – 50 ng Protein [85]. Aufgrund ihres sehr engen linearen Fensters ($< \text{eine Dekade}$) ist sie nur bedingt für quantitative Zwecke verwendbar.

2.1.5.1.F Differenzgelelektrophorese

Bei der Differenzgelelektrophorese werden bis zu drei Proteinproben, z. B. zwei Test- und eine Standardprobe, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, gemischt und zusammen auf einem Gel elektrophoretisch getrennt. Die Farbstoffe sind bei unterschiedlichen Wellenlängen detektierbar. Dadurch wird die simultane Analyse von zwei Proteinproben und eines internen Standards auf einem einzigen Gel möglich [38]. Es gibt zwei unterschiedliche Methoden der Proteinmarkierung (Labeling): minimale Markierung und Sättigungsmarkierung. Ein Problem beider DIGE-Methoden ist die proteinspezifische Anfärbbarkeit [108]. Zur Auswertung sind Fluoreszenz-Imager erforderlich.

Meistens wird die Minimal-Markierung durchgeführt [96]. Zu den bekanntesten DIGE-Farbstoffen gehören die einfach positiv geladenen synthetischen N-hydroxysuccinimidylester-Derivate (NHS-Derivate) der Cyaninfarbstoffe NHS-Cy3 und NHS-Cy5 mit ähnlichen Molekularmassen, deren Fluoreszenz bei 590 nm bzw. 680 nm erfasst werden. Der dritte Farbstoffderivat ist NHS-Cy2 und lässt sich bei 530 nm detektieren, allerdings ist die Molekularmasse kleiner als die der erstgenannten Farbstoffe [108]. Vor der elektrophoretischen Trennung werden die primären Amino-Gruppen (N-terminale Amino- und Lysin-Reste) der Proteine mit den Farbstoffen kovalent vernetzt. Dabei liegen die Farbstoffmoleküle in Unterzahl vor, so dass nur maximal 5 % der lysinhaltigen Probe modifiziert werden. Die restlichen Proteine bleiben unverändert und können nach der Elektrophorese mit Fluoreszenz- oder sichtbaren Farbstoffen angefärbt und lokalisiert werden [108]. Allerdings weichen die isoelektrischen Punkte und Molekularmassen dieser von den ursprünglichen Proteinen ab. Die Detektionsgrenze liegt bei 1 ng und die Methode bietet einen lineardynamischen Bereich über vier Dekaden.

Vor der Sättigungsmarkierung wird die Probelösung erst reduziert und danach mit einem Überschuss an Fluoreszenzfarbstoffmolekülen versetzt, die statt der NHS-Derivate eine Maleinimid-Gruppe tragen und kovalent an alle Cystein-Reste der Proteine binden. Dabei finden auch Mehrfachmarkierungen von Proteinen statt, so dass die Sensitivität (DL bei 0,1 ng) im Vergleich höher als die Minimalmarkierung und Silberfärbung ist [109]. Dahingegen ist die Verschiebung der tatsächlichen Moleku-

larmasse stärker [108] und diese Detektion ist nur auf cysteinhaltige Proteine beschränkt [110], die rund 85 – 90 % der Proteine des Genoms darstellen [99]. Im Gegensatz zur Minimalmarkierung stehen hier nur Cy3 und Cy5 zur Verfügung, so dass nur ein Standard und eine Probe gleichzeitig auf einem Gel analysiert werden können [109].

2.1.5.2 Detektionssysteme

Um die mit der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zu quantifizieren, müssen die Gele nach der Färbung digitalisiert werden [1, 38]. Dafür kommen entweder Flachbett-Scanner, die mit Weißlicht- oder Laser-Strahlern ausgestattet sind, oder CCD-Kameras in Frage [78] (Tabelle 2-3). Mit ihnen kann die Lichtabsorption einer Proteinbande in 1-D Gelen oder eines Spots in 2-D Gelen bestimmt werden.

Tabelle 2-3: Vergleich der gängigen Detektionssysteme für die Gelelektrophorese.

| Detektor | Vorteil | Nachteil |
|--------------------------|---|--|
| CCD-Kamera (fixiert) | <ul style="list-style-type: none">• schnelle Detektion (3 – 10 s/Gel) | <ul style="list-style-type: none">• Auflösung beschränkt durch CCD-Chips (max. 2000 x 2000 Pixel)• Randeffekt• hohe Anschaffungskosten |
| CCD-Kamera (flexibel) | <ul style="list-style-type: none">• höhere Auflösung | <ul style="list-style-type: none">• zeitaufwendig (30 min./Gel)• große Geräte• Bilder mit variierenden Hintergrundsignalen• hohe Anschaffungskosten |
| Weißlicht-Scanner | <ul style="list-style-type: none">• niedrige Anschaffungskosten | <ul style="list-style-type: none">• niedrigeres S/N |
| Laser-Scanner | <ul style="list-style-type: none">• selektiv• simultane Detektion bei 2 Wellenlängen• höheres S/N | <ul style="list-style-type: none">• zeitaufwendig bei hoher Auflösung• hohe Anschaffungskosten |

Mittels der Detektionssysteme werden die Gelinformationen digitalisiert. Für 1-D Gele erstellt man Graphen der Extinktion $\log I_0/I$ in Abhängigkeit von der Trennstrecke. Für 2-D Gele erhält man 3-D „Landschaften“, d. h. x- und y-Achsen entsprechen den Gelkoordinaten, die „Höhenlinie“ z den Signalintensitäten (Abbildung 2-17) [38].

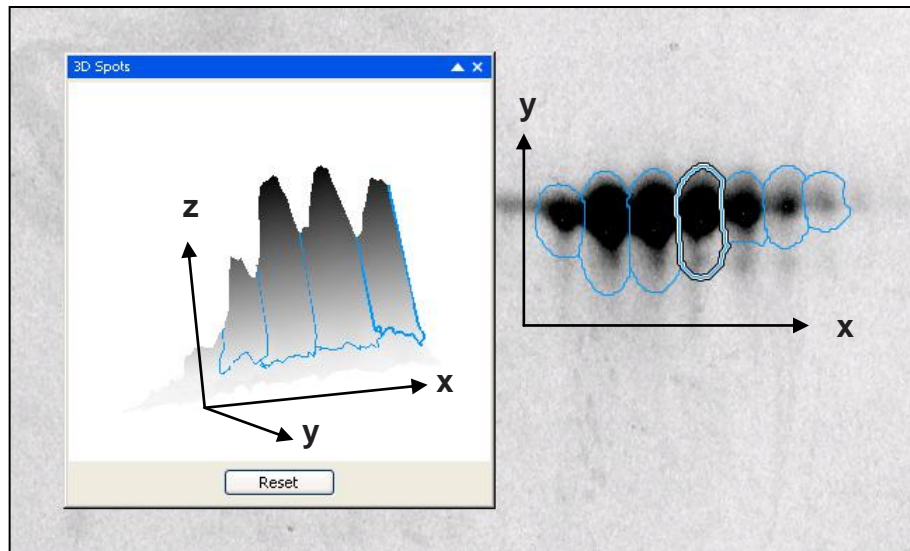


Abbildung 2-17: 3-D Spot-Ansicht (links) und das zugehörige 2-D Gelbild vom bovinen Serumalbumin (rechts), Software: Delta2D.

Zu beachten ist, dass das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 25), die lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration, nur für verdünnte Lösungen gilt. In Gelen beobachtet man bei bestimmten Konzentrationen sigmoide oder hyperbolische Verläufe, daher muss vor jeder Quantifizierung jeweils der lineare Bereich bestimmt werden [38].

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_x}\right) = \epsilon_x \cdot c \cdot d_s \quad \text{(Gleichung 25)}$$

| | |
|--------------|--|
| A | Absorption |
| I_0 | Intensität der eintretenden Wellenlänge |
| I_x | Intensität der austretenden Wellenlänge |
| ϵ_x | molarer Absorptionskoeffizient [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$] |
| c | molare Konzentration der absorbierenden Substanz [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] |
| d_s | Schichtdicke [mm] |

Die meisten CCD-Kameras sind fest in einer Dunkelkammer fixiert, die mit einer VIS/UV-Lampe für sichtbare Färbungen oder Xenon-Gasentladungslampe als Strahlungsquelle für Fluoreszenzmessungen ausgestattet ist [111]. Die Lichtsignale werden von den CCD-Sensoren in digitale Signale umgewandelt. Da das Hintergrundrauschen mit einer Temperaturerhöhung zunimmt, werden die CCD-Sensoren gekühlt [112]. Nachteile der CCD-Kameras sind Randeffekte und bei der fixen Konstellation eine limitierte maximale Auflösung abhängig von der Pixel-Zahl der CCD-Chips, die meistens 200 µm beträgt [111]. Um höhere Auflösungen zu erzielen, verwendet man mobile Kameras, die mehrere Bilder von einer Fläche erstellen und diese zusammenfügen. Damit verbunden sind dagegen ein höherer Preis und Zeitaufwand, der größere Platzbedarf für das Gerät und ungleichmäßige Hintergründe des Gelbildes [111].

Densitometer-Scanner arbeiten nach dem Prinzip eines beweglichen Photometers [1]. Die Lichtquelle und der Detektor sind mobil, sie tasten die gesamte Gelfläche abhängig von der Einstellung der Auflösung Punkt für Punkt ab.

Die Weißlicht-Scanner verwenden als Lichtquelle meistens eine Kaltkathoden- oder Xenonlampe, die mit entsprechenden Filtern auf den gewünschten Wellenlängenbereich eingestellt wird [103]. Im Vergleich zu den Büro-Scannern ist die Scanfläche durch eine Isolierung gegen Flüssigkeiten geschützt, so dass Gele auch nass vermessen werden können [103]. Je nach Einstellung wird entweder das von den Gelen und Glasscheiben reflektierte oder das transmittierte Lichtsignal aufgenommen.

Die Laser-Scanner bestrahlen die Gele mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Danach wird die Emission über eine Photomultiplier-Röhre (PMT) verstärkt und in digitale Signale überführt [103]. Je nach Anforderungen stehen für Fluoreszenzfärbung, sichtbare Färbungen wie Silber oder Coomassie sowie für Phosphor-Imaging von radioaktiven Proteinen diverse Laser und zugehörige Filter zur Verfügung. Für Fluoreszenzdetektion werden meist sogenannte Long-Pass-Filter verwendet, d. h. der Filter lässt Licht aller Wellenlängen passieren, die größer als die eingestrahlte Wellenlänge ist. Ihre Vorteile gegenüber Weißlicht-Scannern sind die verbesserte Ein-

dringtiefe [113], die Linearität über einen breiten Konzentrationsbereich [114] und die Möglichkeit der Simultanbestimmung [111].

Bei den Scannern sind für die Auflösung 3 Parameter maßgebend: die Breite des Lichtstrahls, die Strecke zwischen den Messpunkten und die Tiefe der Messung [38].

Die Breite des Lichtstrahls ist jeweils geräteabhängig und kann von dem Anwender nicht verändert werden. Ein schmaler Lichtstrahl erhöht die Auflösung, allerdings gibt es eine Mindestbreite, weil mit der Lichtstrahlbreite auch die Signalintensität abnimmt. Für weißes Licht beträgt die Mindestbreite 100 μm und für Laserstrahlen 50 μm [1].

Die Strecke zwischen den einzelnen Messpunkten muss kleiner als die Lichtstrahlbreite sein, um Auflösungsverluste zu vermeiden [1]. Dieser Parameter lässt sich bei Scannern über „Auflösung“ einstellen.

Der letzte Parameter, die Tiefe der Messung bzw. der Fokussierung der Lichtstrahlen, lässt sich nur bei manchen Laser-Scannern (z. B. Odyssey Imaging System von Li-Cor Biosciences) einstellen. Wenn möglich soll dieser in der Gelmitte liegen. Da weiße Lichtstrahlen nur an der Geloberfläche fokussieren, sind vor allem für dickere Gele ($> 1 \text{ mm}$) Auflösungsverluste zu beobachten. Um in dicken Gelen zu detektieren sind Laser-Detektoren vorzuziehen [38].

2.2 Validierung einer Analysenmethode

Die Methodenvvalidierung ist der Nachweis und Dokumentation, dass eine Analysenmethode die geforderten Leistungen erfüllt [12], d. h. Ergebnisse innerhalb von vordefinierten Spezifikationen liefert [7]. Je nach Einsatzbereich (Identität, Quantifizierung der Hauptkomponente oder der Verunreinigung etc.) müssen bestimmte Parameter (Richtigkeit, Linearität etc.) untersucht werden. Hierzu liegen Vorschläge von der International Conference on Harmonisation (ICH) vor (Tabelle 2-4) [11]. In der Richtlinie ICH Q2(R1) wird die Validierung von analytischen Methoden beschrieben.

Tabelle 2-4: Vorschlag der zu prüfenden Parameter für jeweilige Analysenmethode, +: erforderlich, -: nicht erforderlich, aus [115].

| Analysenmethode | Mindestanzahl | Identität | Verunreinigung | | Gehalt der Hauptkomponente |
|---------------------------|---------------|-----------|------------------|--------------|----------------------------|
| | | | Quantifizierung | Grenzprüfung | |
| Richtigkeit | 9 (3x3) | - | + | - | + |
| Präzision | | | | | |
| Wiederholbarkeit | 6 o. 9 | - | + | - | + |
| Interm. Präzision | 2 Serien | - | + ⁽¹⁾ | - | + ⁽¹⁾ |
| Spezifität ⁽²⁾ | - | + | + | + | + |
| Detektionsgrenze | variabel | - | - ⁽³⁾ | + | - |
| Quantifizierungsgrenze | | - | + | - | - |
| Linearität | 5 | - | + | - | + |
| Arbeitsbereich | - | - | + | - | + |

(1) intermediäre Präzision nicht notwendig, wenn Reproduzierbarkeit (z. B. Ringversuche in mehreren Laboren) bereits nachgewiesen

(2) gegebenenfalls zusätzliche Tests, wenn Methode nicht spezifisch

(3) eventuell erforderlich

2.2.1 Begriffsdefinitionen

2.2.1.1 Präzision und Richtigkeit

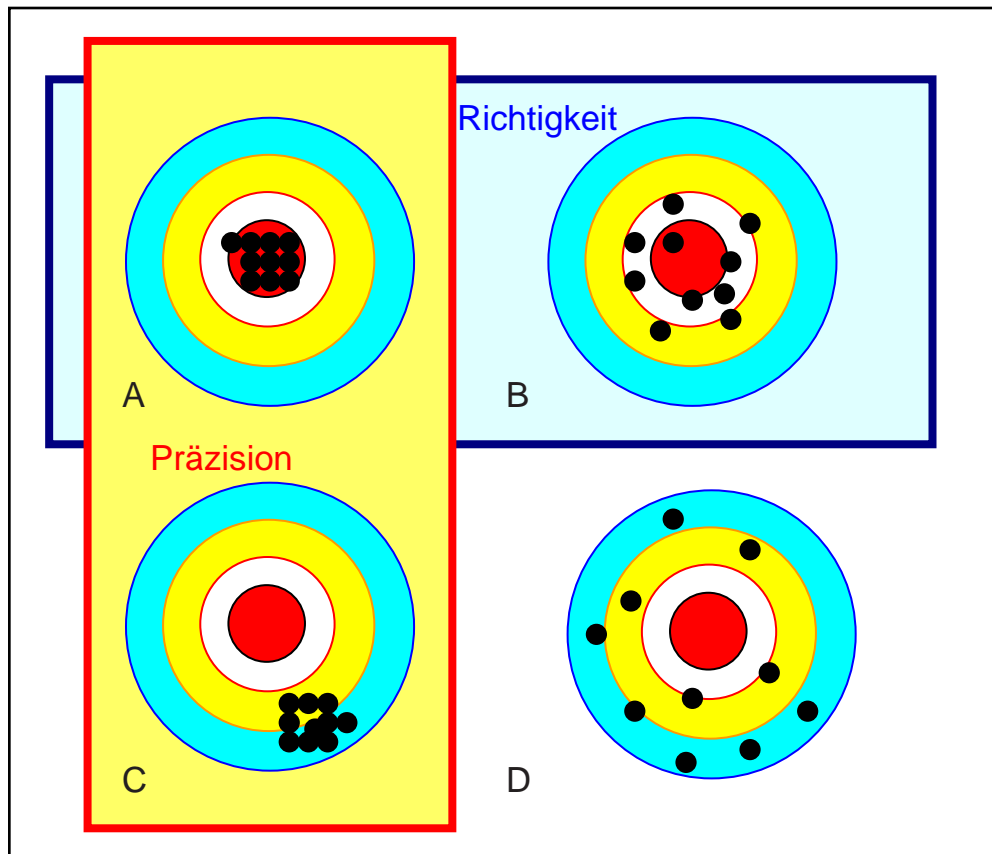


Abbildung 2-18: Schema zur Richtigkeit und Präzision, A: richtig und präzise; B: richtig, nicht präzise; C: falsch und präzise; D: falsch und nicht präzise.

Die Präzision oder Reproduzierbarkeit einer Analysenmethode beschreibt den Grad der Übereinstimmung von Werten innerhalb einer Messreihe, die durch mehrfache Probennahme aus derselben homogenen Probe gewonnen werden [11]. Ist die Streuung der Messergebnisse gering, liegt gute Präzision vor [12] (Abbildung 2-18).

Die Streuung der Messergebnisse lässt sich in Form von prozentualer relativer Standardabweichung (RSD%) (Gleichung 26) oder auch des Variationskoeffizienten (CV) (Gleichung 27) ausdrücken [7].

$$\text{RSD\%} = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 26})$$

RSD% relative Standardabweichung [%]
 $\hat{\sigma}$ Standardabweichung
 \bar{x} Mittelwert

$$\text{CV} = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{x}} \quad (\text{Gleichung 27})$$

CV Variationskoeffizient (dimensionslos)
 $\hat{\sigma}$ Standardabweichung
 \bar{x} Mittelwert

Die Standardabweichung $\hat{\sigma}$ wird nach Gleichung 28 berechnet.

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gleichung 28})$$

$\hat{\sigma}$ Standardabweichung
 \bar{x} Mittelwert
n Stichprobenumfang

Die Präzision lässt sich in Wiederholpräzision (Engl.: repeatability), intermediäre Präzision (Engl.: intermediate precision) und Vergleichspräzision (Engl.: reproducibility) untergliedern. Die Wiederholpräzision wird durch die Wiederholstandardabweichung beschrieben. Hierfür wird dieselbe Probe wiederholt mittels einer Analysenmethode unter identischen Versuchsbedingungen, d. h. von einem Analytiker mit den gleichen Geräten und Reagenzien innerhalb eines kurzen Zeitraums durchgeführt.

Findet die Wiederholung der Analysen im selben Labor an verschiedenen Tagen, von einem anderen Analytiker oder Gerät oder mit anderen Reagenzienlösungen statt, dann erhält man mit Gleichung 28 die Mehrtages- bzw. Intra-Laboratoriumsstandardabweichung, die auf die Güte der Intermediärpräzision schließen lässt.

Werden die Messungen derselben Probe in unterschiedlichen Laboren durchgeführt, z. B. im Ringversuch, wird die Vergleichsstandardabweichung, die Reproduzierbarkeit, ermittelt. Hier spielen neben der zufälligen Messwertstreuung die äußeren Einflüsse wie Temperatur, Raumfeuchte, Erfahrung des Laborpersonals etc. eine Rolle. Je größer der Zeitraum für die Ermittlung der Mehrtagesstandardabweichung in demselben Labor ist, desto mehr nähert sich dieser Wert der Vergleichsstandardabweichung an [12].

Meistens besteht ein Analysenverfahren aus mehreren Teilschritten, z. B. Probennahme (PN), Probenvorbereitung (PV) und Messung (M). Nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz trägt jede Streuung dieser Einzelschritte zur Gesamtstreuung bei [116] (Gleichung 29).

$$SD_{\text{Total}} = \sqrt{SD_{\text{PN}}^2 + SD_{\text{PV}}^2 + SD_{\text{M}}^2} \quad \textbf{(Gleichung 29)}$$

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| SD_{Total} | Gesamtstreuung |
| SD_{PN}^2 | Varianz der Probennahme |
| SD_{PV}^2 | Varianz der Probenvorbereitung |
| SD_{M}^2 | Varianz der Messung |

2.2.1.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)

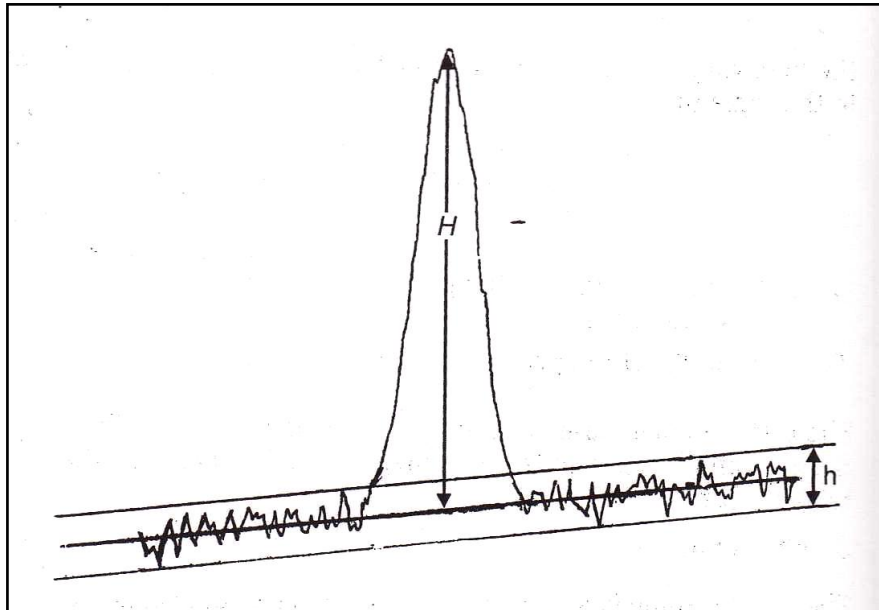


Abbildung 2-19: Die Bestimmung des S/N in Abhängigkeit von der Signalthöhe H und der maximalen Amplitude des Rauschens h, aus [45].

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) wird anhand der Signalthöhe H und der maximalen Höhe des Untergrundrauschens h der Basislinie bestimmt (Gleichung 30 und Abbildung 2-19).

$$S/N = \frac{2 \cdot H}{h} \quad \text{(Gleichung 30)}$$

| | |
|-----|--|
| S/N | Signal-zu-Rausch-Verhältnis |
| H | Höhe des Signals [cm] |
| h | maximale Höhe des Untergrundrauschens [cm] |

Der Parameter h ist die maximale Amplitude der Basislinie, die im Idealfall in einem Bereich der fünffachen Halbwertsbreite und symmetrisch um den Signal-Peak herum bestimmt wird [45]. Für präzise quantitative Messungen sind hohe S/N notwendig [117]. Idealerweise sollen diese mindestens größer als 100 sein.

2.2.1.3. Linearität

Die Linearität der Analysenmethode soll entweder über eine Verdünnungsreihe einer Standardlösung oder über einzelne Einwaagen über den gesamten Arbeitsbereich geprüft werden [11]. Die ICH empfiehlt 5 Messpunkte für die Testung der Linearität.

2.2.1.4. Detektionsgrenze und Bestimmungsgrenze

Die Detektionsgrenze (Engl.: limit of detection, DL) beschreibt die kleinste noch nachweisbare Konzentration einer Substanz, die mit ausreichender Wahrscheinlichkeit erkennbar ist [11]. Eine Substanz ist laut Arzneibuch detektierbar, wenn die Signalthöhe mehr als das Dreifache des S/N beträgt. Die Bestimmungsgrenze (Engl.: limit of quantitation, QL) ist die kleinste, mit ausreichender Präzision und Richtigkeit, quantitativ erfassbare Konzentration. Ist eine RSD% von 10 % ausreichend, liegt sie bei dem 10-fachen des S/N [7]. Ist allerdings eine höhere Präzision erforderlich, sind höhere S/N nötig.

2.2.2 Statistische Beurteilung von Versuchsergebnissen

2.2.2.1 Allgemeines

Die analytische Statistik, der die statistische Beurteilung von Messdaten zuzuordnen ist, versucht mittels der Untersuchung eines repräsentativen Teils einer Grundgesamtheit, einer Stichprobe, Schlüsse auf die Grundgesamtheit zu ziehen [118]. Die Auswahl der Stichprobe erfolgt zufällig, d. h. die Wahrscheinlichkeit jeder Einheit in die Stichprobe zu gelangen ist gleich groß. Der Grund für eine Untersuchung einer Stichprobe liegt in der Unmöglichkeit, die tatsächliche Grundgesamtheit zu untersuchen. So können in der Qualitätskontrolle eines pharmazeutischen Unternehmens schon aus wirtschaftlichen Gründen wie Kosten und Zeit nicht die gesamte Produktion getestet werden [119].

Auch bei der Auswahl der Stichproben ist ein Risiko gegeben, keine repräsentative Stichprobe zu erhalten, bekannt als Stichprobenfehler. Nach dem Gesetz der großen

Zahlen wird jedoch der Stichprobenfehler umso kleiner, je größer die Anzahl der Stichproben ist.

In diesem und den folgenden Abschnitten wird der wahre Mittelwert und die wahre Varianz mit μ bzw. σ^2 angegeben, der Mittelwert der Stichprobe und die Varianz der Stichprobe mit \bar{x} bzw. $\hat{\sigma}^2$.

Für viele statistische Testungen wird eine Normalverteilung der Einzelwerte vorausgesetzt. Nach dem zentralen Grenzwertsatz ist die Summe der einzelnen Zufallsvariablen mit Mittelwert μ und Standardabweichung σ bei einer großen Stichprobe, $n \rightarrow \infty$, annähernd normalverteilt.

Die Dichtefunktion der Normalverteilung $f(x)$ oder $N(\mu, \sigma)$, auch Gauß-Verteilung genannt, wird durch eine Glockenkurve für die Werte $-\infty < x < \infty$ beschrieben und weist eine Symmetrie um den Mittelwert μ auf (Abbildung 2-20 und Gleichung 31). Die Gesamtfläche unter der Kurve beträgt 1. Nach einer z-Transformation (Gleichung 32) lassen sich alle Normalverteilungen $f(x)$ in die Standardnormalverteilung $f(z)$ oder $N(0,1)$ mit Mittelwert $\mu = 0$ und der Standardabweichung $\sigma = 1$ überführen (Gleichung 33).

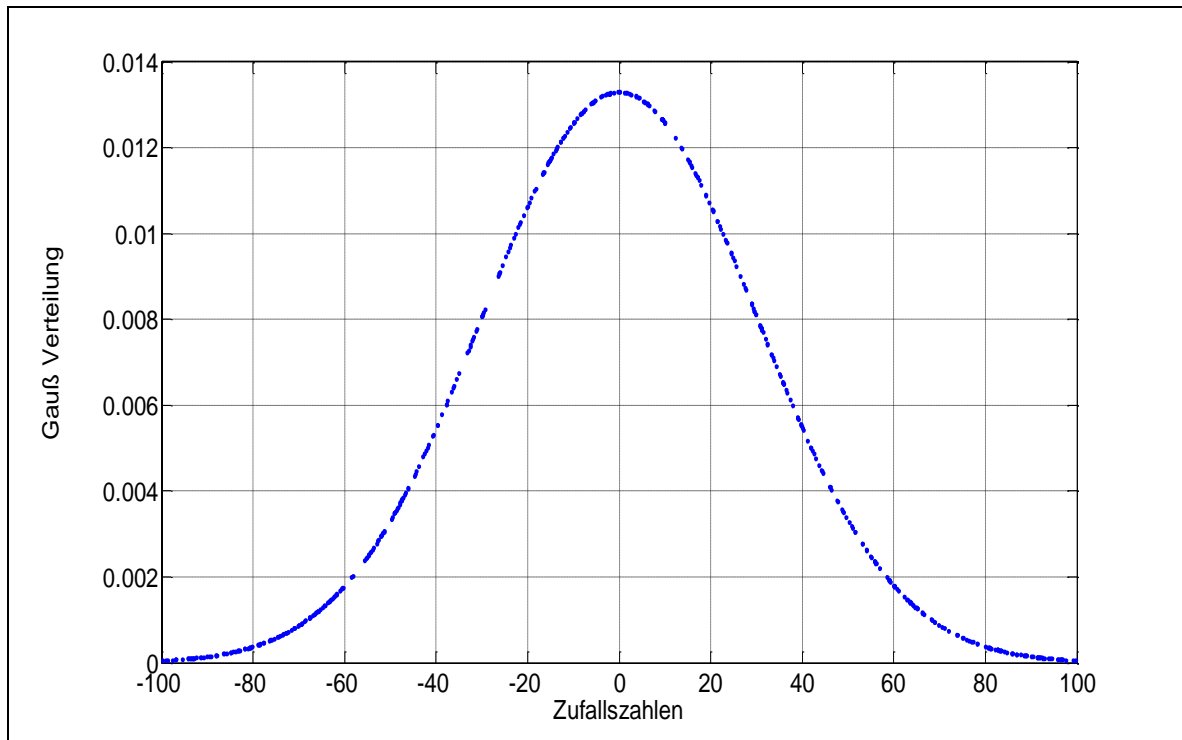


Abbildung 2-20: Die Dichtefunktion der Normalverteilung $f(x)$.

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\left(\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)} \quad \text{(Gleichung 31)}$$

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad \text{(Gleichung 32)}$$

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\left(\frac{z^2}{2}\right)} \quad \text{(Gleichung 33)}$$

x Messwerte

μ Mittelwert der Grundgesamtheit

σ Standardabweichung der Grundgesamtheit

2.2.2.2 Aufstellen einer Hypothese

Der erste Schritt einer statistischen Prüfung besteht in der Formulierung der zu prüfenden statistischen Hypothesen [118]. Man unterscheidet zwischen der Null- (H_0) und der Alternativ- oder Gegen-Hypothese (H_1). Die Null-Hypothese dient als Arbeitshypothese, die einen Unterschied oder Zusammenhang darstellt und die Gleichheit nicht ausschließt ($=$, \leq , \geq). Das Ziel der Testung ist die Ablehnung der Null-Hypothese und die Annahme der ihr inhaltlich entgegengesetzten Alternativ-Hypothese. Würde eine Null-Hypothese $H_0: \mu = 100$ lauten, dann wäre die passende Alternativ-Hypothese $H_1: \mu \neq 100$.

Kann eine Null-Hypothese nicht verworfen werden, sind mögliche Ursachen, dass (I) die Null-Hypothese tatsächlich zutrifft, (II) eine zu kleine Stichprobe gewählt wurde oder (III) eine zu große Messwertstreuung vorliegt.

2.2.2.3 Prüfung einer Hypothese

Die Prüfung einer statistischen Hypothese kann entweder einseitig (z. B. bei $H_0: \mu \leq 100$ bzw. $\mu \geq 100$) oder zweiseitig (z. B. bei $H_0: \mu = 100$) erfolgen. Der nächste Schritt ist die Festlegung der Stichprobenzahl n , der Prüfgröße T und der Irrtumswahrscheinlichkeit α [32]. Auf dieser Basis wird ein Ablehnungsbereich errechnet. Je nachdem ob die Hypothese einseitig oder zweiseitig getestet wird, ist die Wahrscheinlichkeit (P-Wert) der Prüfgröße unter H_0 in den Ablehnungsbereich zu fallen höchstens gleich α , bzw. je $\alpha/2$.

2.2.2.4 Fällung der Entscheidung

Unterschreitet dieser P-Wert die α -Wahrscheinlichkeit, fällt die Prüfgröße in den Ablehnungsbereich und H_0 wird unter Annahme von der Irrtumswahrscheinlichkeit α abgelehnt.

Der α -Fehler ist die Wahrscheinlichkeit, H_0 fälschlicherweise zu verwerfen, und als Fehler 1. Art bekannt (Abbildung 2-21 und Tabelle 2-5). Im Fallbeispiel möchte Lieferant A Ware an Kunde B verkaufen. Seine Ware ist einwandfrei, jedoch wurden nach stichprobenartiger Kontrolle aufgrund zufälliger Streuungen die Spezifikationen der Ware nicht erfüllt. Lieferant A muss seine Ware zurücknehmen und für die entstandenen Kosten aufkommen. Dieser Fehler wird daher auch Lieferantenrisiko genannt.

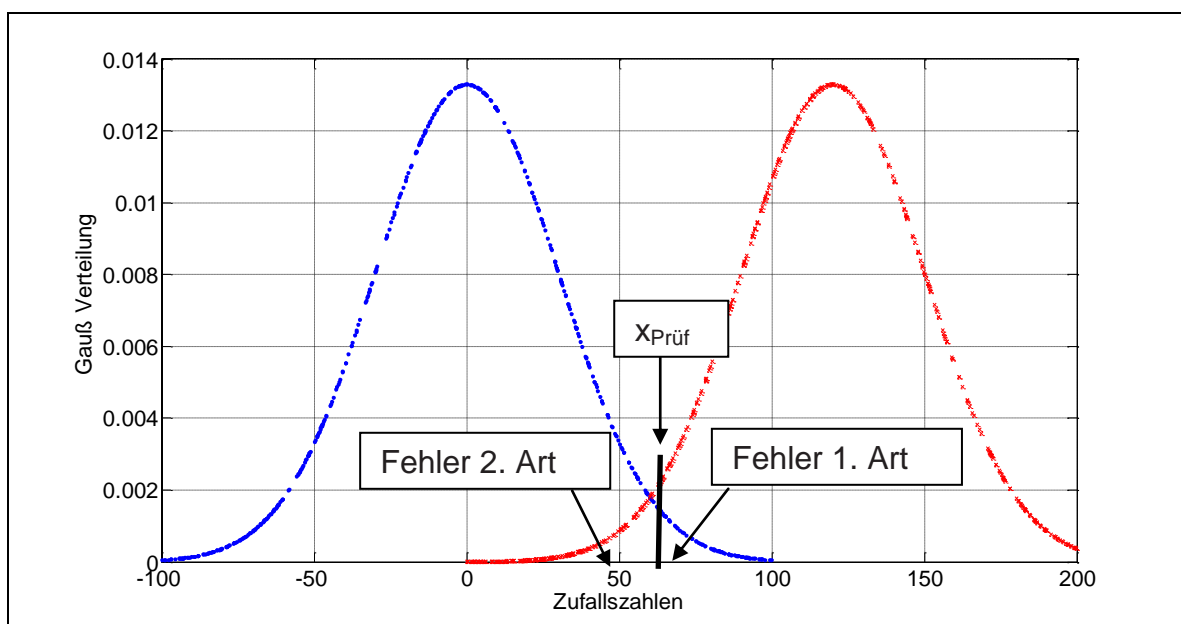


Abbildung 2-21: Schemadarstellung einer „Nicht-Ausreißer“-Population (blau) und einer Ausreißer-Population (rot), ein hoher Schwellenwert $x_{\text{Prüf}}$, abhängig von der Irrtumswahrscheinlichkeit α , verursacht einen kleinen Fehler 1. Art, begünstigt aber den Fehler 2. Art.

Der Fehler 2. Art, auch β -Fehler genannt, tritt ein, wenn H_0 aufgrund eines Testausgangs fälschlicherweise nicht verworfen wird (Abbildung 2-21 und Tabelle 2-5). Mit dem letzten Beispiel bedeutet dies, dass fehlerhafte Ware von Lieferant A bei den

stichprobenartigen Kontrollen nicht entdeckt wird. Diesmal ist der Kunde B der Risikoträger, daher wird der Fehler 2. Art auch Konsumentenrisiko genannt.

Unter Power oder Testschärfe einer statistischen Prüfung versteht man die Wahrscheinlichkeit, eine richtige Alternativ-Hypothese H_1 zu erkennen, berechnet durch $1 - \beta$ (Tabelle 2-1). Eine kleine Irrtumswahrscheinlichkeit α führt zwar zu einer sicheren Aussage, kleiner Fehler 1. Art, aber gleichzeitig zu einem höheren Fehler 2. Art und einer niedrigeren Testschärfe. Damit nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, unberechtigt H_0 beizubehalten.

Tabelle 2-5: Vier-Felder-Tafel der möglichen Entscheidungen im statistischen Test.

| Testentscheidung | Wirklichkeit | |
|--------------------|---|--|
| | H_0 (wahr) | H_0 (falsch) |
| Ablehnung H_0 | α -Fehler (Fehler 1.Art) „Lieferanten-Risiko“ | richtige Entscheidung mit der Power $1 - \beta$ |
| Beibehaltung H_0 | richtige Entscheidung mit Signifikanzniveau $1 - \alpha$ | β -Fehler (Fehler 2.Art) „Konsumenten-Risiko“ |

2.2.3 Häufig verwendete statistische Testungen

2.2.3.1 Der F-Test

Mit dem F-Test wird geprüft, ob sich die Varianzen σ^2 zweier Grundgesamtheiten auf dem Signifikanzniveau α , oder auch Irrtumswahrscheinlichkeit α genannt, unterscheiden [33]. Bezogen auf die pharmazeutische Industrie könnte die Frage geklärt werden, ob ein neues Herstellungsverfahren eine bessere Präzision, d. h. weniger streuende Werte, liefert [118]. Nach Kapitel 2.2.2.1 werden zunächst eine Null- und eine Alternativ-Hypothese aufgestellt (Gleichung 34).

$$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \text{ bzw. } H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \quad \text{(Gleichung 34)}$$

H_0 besagt, dass beide Varianzen sich nur zufällig unterscheiden und homogen sind.
 H_1 behauptet, dass sich beide Varianzen signifikant voneinander unterscheiden.

Die Prüfgröße $T_{\text{Prüf}}$ ist der Quotient aus den beiden Varianzen $\hat{\sigma}_1^2$ und $\hat{\sigma}_2^2$, wobei der größere Wert immer im Zähler steht (Gleichung 35).

$$T_{\text{Prüf}} = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2}, \quad \hat{\sigma}_1^2 \geq \hat{\sigma}_2^2 \quad \text{(Gleichung 35)}$$

Dieser $T_{\text{Prüf}}$ -Wert wird dann gegen einen tabellierten F_{krit} -Wert verglichen, der die obere Signifikanzgrenze der F-Verteilung darstellt und abhängig von den Freiheitsgraden der Stichproben f_1 , f_2 und der Irrtumswahrscheinlichkeit α ist. Allerdings gelten die Tabellenwerte für einseitige Fragestellungen, für zweiseitige Fragestellungen wird α halbiert (Gleichung 36).

$$F_{\text{krit}} = F_{f_1, f_2; \alpha/2} \quad \text{(Gleichung 36)}$$

Überschreitet der Prüfwert $T_{\text{Prüf}}$ den Tabellenwert F_{krit} (Gleichung 37), wird die Nullhypothese unter der Irrtumswahrscheinlichkeit α verworfen.

$$T_{\text{Prüf}} > T_{\text{krit}} \quad \text{(Gleichung 37)}$$

Der F-Test lässt sich auch einseitig durchführen mit den Hypothesen (Gleichung 38):

$$\begin{aligned} H_0 : \sigma_1^2 \leq \sigma_2^2 \text{ und } H_1 : \sigma_1^2 > \sigma_2^2 \\ \text{oder } H_0 : \sigma_1^2 \geq \sigma_2^2 \text{ und } H_1 : \sigma_1^2 < \sigma_2^2 \end{aligned} \quad \text{(Gleichung 38)}$$

Der Tabellenwert F_{krit} ist entsprechend (Gleichung 39):

$$F_{\text{krit}} = F_{f_1, f_2; \alpha} \quad \text{(Gleichung 39)}$$

2.2.3.2 Der t-Test (Student's t-test)

Der **Einstichproben-t-Test** dient als Ist-Sollwert-Vergleich, er vergleicht einen Stichprobenmittelwert mit dem Erwartungswert einer normalverteilten Grundgesamtheit unter der Annahme, dass die Standardabweichungen unbekannt sind [120]. Wie für Signifikanztests üblich, wird zunächst die Null-Hypothese aufgestellt. Diese lautet, dass unter der Annahme der Irrtumswahrscheinlichkeit α der Stichprobenmittelwert und Erwartungswert einer Grundgesamtheit entstammen (Gleichung 40). Die zugehörige Alternativ-Hypothese lautet, dass der Mittelwert der Stichprobe nicht Teil der Grundgesamtheit ist (Gleichung 40).

$$H_0 : \bar{x} = \mu \text{ und } H_1 : \bar{x} \neq \mu \quad \textbf{(Gleichung 40)}$$

Für die einseitige Fragestellung, die Überschreitung oder Unterschreitung eines Soll-Wertes, wird die Gleichung 41 eingesetzt.

$$H_0 : \bar{x} \leq \mu \text{ und } H_1 : \bar{x} > \mu \text{ bzw. } H_0 : \bar{x} \geq \mu \text{ und } H_1 : \bar{x} < \mu \quad \textbf{(Gleichung 41)}$$

Die Hypothesenprüfung wird mit Gleichung 42 durchgeführt:

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{|\bar{x} - \mu|}{\hat{\sigma}} \cdot \sqrt{n} \quad \textbf{(Gleichung 42)}$$

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| $t_{\text{Prüf}}$ | Prüfwert |
| \bar{x} | Stichprobenmittelwert |
| μ | Erwartungswert |
| $\hat{\sigma}$ | Standardabweichung der Stichprobe |
| n | Anzahl Stichproben |

Da auf Gleichheit geprüft wird, erfolgt dieser Test zweiseitig. Wie beim F-Test sind die kritischen Grenzwerte t_{crit} tabelliert mit $df = n-1$. H_0 wird verworfen, wenn der Prüfwert größer als der tabellierte t-Wert ist (Gleichung 43).

$$t_{\text{Prüf}} > t_{\text{crit}} \quad \textbf{(Gleichung 43)}$$

Der **Zwei-Stichproben-t-Test** vergleicht die Mittelwerte zweier unabhängiger Messreihen miteinander. Es wird getestet, ob die Differenz zwischen den Mittelwerten der Stichproben zufälligen Ursprungs ist. Daher lautet die H_0 -Hypothese: Die geschätzten Mittelwerte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander (Gleichung 44).

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \text{ und } H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \quad \textbf{(Gleichung 44)}$$

Unter der Voraussetzung der Normalverteilung und Varianzhomogenität erfolgt die zugehörige Prüfung der Hypothese mit Gleichung 45 und Gleichung 46:

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\hat{\sigma}_{\text{pooled}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad \textbf{(Gleichung 45)}$$

$$\hat{\sigma}_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_1 \cdot (n_1 - 1) + \hat{\sigma}_2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \textbf{(Gleichung 46)}$$

| | |
|--------------------------------|--|
| $t_{\text{Prüf}}$ | Prüfwert |
| \bar{x}_i | Stichprobenmittelwert |
| $\hat{\sigma}_{\text{pooled}}$ | gepoolte Standardabweichung der Stichprobe |
| $\hat{\sigma}_i$ | Standardabweichung der Stichprobe |
| n_i | Stichprobengröße |

Für den Freiheitsgrad gilt $df = n_1 + n_2 - 2$.

Sind die Varianzen unbekannt oder nicht gleich, wird die Prüfgröße $t_{\text{Prüf}}$ und der zugehörige Freiheitsgrad df nach Gleichungen 47 und 48 berechnet.

$$t_{\text{Prüf}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}_1^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_2^2}{n_2}}} \quad \textbf{(Gleichung 47)}$$

$$df = \frac{\left(\frac{\hat{\sigma}_1^2}{n_1} + \frac{\hat{\sigma}_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{\hat{\sigma}_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{\hat{\sigma}_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}} \quad \text{(Gleichung 48)}$$

Ist der Prüfwert $t_{\text{Prüf}}$ größer als der kritische Wert t_{krit} bzw. $t_{df;1-\alpha/2}$, so wird H_0 verworfen und ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten liegt vor.

2.2.3.3 Ausreißertests

Ausreißer sind Werte, die von den restlichen Werten einer Stichprobe abweichen [121, 122]. Sie können in jeder Messserie, sowohl in der chemischen und pharmazeutischen Forschung [37] als auch innerhalb eines Labors [123, 124] oder bei Ringversuchen [125] auftauchen. Die Ursachen ihrer Entstehung müssen abgeklärt werden.

Einige konventionelle Ausreißertests [122] und Methoden der robusten Statistik, die auch zur Ausreißerdetektion dienen [126], werden in Kapitel 6 näher erläutert.

3. Varianzquellen der Gelelektrophorese, Stand der Technik

In der Proteomforschung interessiert man sich für Biomarker, also für die Proteine, deren Konzentrationen bei Eintreten einer Krankheit oder durch eine Medikamentengabe erhöht oder besonders niedrig sind. Diese können in der Arzneimittelforschung für neue Wirkstoffe als Ziele dienen [127], den Grad der Krankheit anzeigen [128] oder neue Behandlungsmethoden erschließen. Schließlich besitzen Proteine allgemein eine Schlüsselposition in vielen biologischen Prozessen des Körpers [55].

Tabelle 3-1: Mindestens notwendiger Faktor, um den sich Ergebnisse aus zwei Messreihen unterscheiden müssen, damit ein Expressionsunterschied in Abhängigkeit von der Messwertstreuung (RSD%) als signifikant angenommen werden kann; Annahme: je Dreifachmessungen, $\alpha = 0,05$ (zweiseitige Fragestellung).

| RSD% | 30 % | 20 % | 10 % | 5 % |
|--------|------|------|------|------|
| Faktor | 1,7 | 1,5 | 1,25 | 1,12 |

Die Messwertstreuung in der Proteomforschung wird durch die biologische Variabilität und die technische Variabilität beeinflusst [129]. Unter der biologischen Variabilität ist die genetische Heterogenität zu verstehen, die eine natürliche Schwankung in der Proteinzusammensetzung von Individuum zu Individuum darstellt. Die technische Variabilität lässt sich auf die Präzision der jeweiligen analytischen Methode zurückführen [130, 131].

Für eine einfache Studie werden z. B. die Serumproteinkonzentrationen zweier Gruppen miteinander verglichen, Gruppe A (erkrankte Probanden) und Gruppe B (gesunde Probanden). Beträgt die technische Variabilität 20 %, dann müssen sich die Messergebnisse um mindestens das 1,5-fache unterscheiden, damit ein relevanter Unterschied erkannt wird (Tabelle 3-1). Geht man davon aus, dass unter den Einzelgruppen eine biologische Variabilität vorhanden ist, so ist ein noch größerer Unterschied nötig.

Biologische Variabilität lässt sich nur durch die Auswahl möglichst homogener Gruppen minimieren. Ist eine technische Variabilität zu groß, kann sie ebenfalls die entscheidenden klinisch und biologisch relevanten Unterschiede überdecken [132]. Eine gute Präzision der Analysenmethode ist daher wichtig, um kleine biologische Unterschiede zu sehen [16, 133].

Für die Analytik pharmazeutischer Proteinarzneistoffe in der Industrie sind validierte Methoden gefordert und damit ist eine hohe Präzision unverzichtbar. Eine prozentuale relative Standardabweichung (RSD%) von $< 2\%$ wie für die Analyse von kleinen Molekülen wird erwartet [117].

Die klassische 2-D-Gelelektrophorese (2-DE), IEF-SDS-PAGE, ist unter den allgemeinen Methoden und als mögliche Analyseverfahren für die In-Prozesskontrolle während der Herstellung und Qualitätskontrolle des Endproduktes in der Monographie „DNA-rekombinationstechnisch hergestellte Produkte“ des Ph. Eur. und USPs aufgeführt [7]. Trotz vielversprechender Forschungsergebnisse [43, 44, 103, 134] und ihrer hohen Trennleistung und Selektivität [5, 77], gibt es noch keine Arzneibuchmonographie, die die 2-DE als Prüfmethode explizit vorschreibt.

Das Problem der 2-DE ist ihre schlechte Reproduzierbarkeit [135], bisher findet man für die 2-DE RSD% von 15 – 60 % [13, 17, 136–138]. Weitere Nachteile der Gelelektrophorese-Technik sind die arbeitsintensiven und manuellen Teilschritte und die lange Analysenzeit [139].

Aufgrund der vielen Arbeitsschritte kommen viele Faktoren als mögliche Fehlerquellen in Frage, wie Probenaufbereitung, Transfer von der ersten Dimension (IEF) auf die zweite (SDS-PAGE), Färben der Gele etc. [10]. Die Arbeitsgruppe Herzel et al. kam zum Schluss, dass eine RSD% von ca. 20 % erreichbar ist [17]. Diese Quellen gilt es zu identifizieren und Schritt für Schritt zu minimieren [20]. Eine detaillierte SOP ist erforderlich, um alle Versuchsbedingungen konstant zu halten [24, 139]. Weitere mögliche Variationsquellen können die Erfahrung des Analytikers [17, 18], der Einfluss von unterschiedlichen Chemikalien- und Reagenzienchargen [16–18], die Integrationssoftware [140] oder auch die Probenvorbereitung [141–144] sein.

Der Einfluss der Variabilität in der Probenaufbereitung und der Aufbewahrung wurde bereits eingehend untersucht [145]. Zusätzlich verursacht das große Konzentrationsgefälle der Proteine in biologischen Proben Schwierigkeiten. Albumin und 10 andere Proteine machen rund 90 % des Serumproteinanteils aus [96]. Um weniger hoch konzentrierte Proteine zu erkennen, müssen die stark vertretenen Proteine mit speziellen Kits aus der Probe entfernt werden, auch diese verursachen eine hohe Variabilität [146].

Valcu et al. sahen die Hauptfehlerquellen in der 2. Dimension und der Färbung des Geles [19]. Die basischen Proteine zeigten eine höhere Variabilität als die sauren Proteine [18, 147]. Des Weiteren zeigten Zhou et al. anhand radioaktiv markierter Proben die möglichen Verluste an Protein während der einzelnen Schritte der 2-DE, die meisten gehen während der Äquilibration verloren [147].

Die Hintergrundfärbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blau (CBB) oder auch Fluoreszenzfarbstoffen wurde als Hauptvarianzquelle identifiziert [18]. Das Problem der Hintergrundfärbung ist ihre unvorhersehbare Schwankung. Diese Schwankung war sowohl bei 1-D als auch bei 2-D Gelen zu sehen.

Diese Fehlerquelle ließ sich reduzieren, indem man CBB gefärbte Gele bei höherer Wellenlänge (700 nm) detektiert [18]. Dadurch erhielt man ein besseres S/N [22]. Die Präzision für die 1-D Trennung wurde auf ca. 5 % RSD% verbessert [23]. Eine andere vielversprechende Detektionsart ist die native Detektion der Proteine [148, 149]. Tryptophan-Reste zeigen eine native Fluoreszenz, allerdings sind die Apparaturen zur Detektion noch nicht kommerziell erhältlich.

Auch die unter Proteomforschern beliebte DIGE-Methode soll die Gel-zu-Gel-Variabilität [94, 108] durch die Trennung mehrerer unterschiedlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben auf nur einem Gel verringern. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe Preis der DIGE-Farbstoffe. Daher existieren nur wenige Publikationen, die die Überlegenheit dieser Detektionsmethode in der Quantifizierung mit statistisch signifikanten Daten belegen können [130, 150]. Die Ergebnisse dieser Studie [130] wurde aber bereits mit einer Studie, bei der die günstigere herkömmliche Fluoreszenzfärbung verwendet worden ist, übertroffen [16].

Um die Gel-zu-Gel-Variabilität zu reduzieren, konstruierten Eravci et al. eigene Apparaturen, um bis zu 24 Gele parallel zu analysieren [16]. So konnten Expressionsunterschiede vom Faktor 1,25 erkannt werden. Ein weiterer Verbesserungsvorschlag ist die Verwendung von Lösungen aus dem gleichen Ansatz für Großprojekte [17, 18].

Nachdem die Hauptfehlerquelle durch die VIS-NIR-Detektion minimiert wurde, konnten auch mögliche minder schwerwiegende Fehler mit einem experimentellen Versuchsdesign untersucht werden [20]. Als mögliche Einflussfaktoren auf die Präzision der Gelelektrophorese wurden die Färbung und Entfärbung der Gele identifiziert. Der Vorgang der Färbung und Entfärbung wurde in dieser Arbeit eingehend untersucht [24].

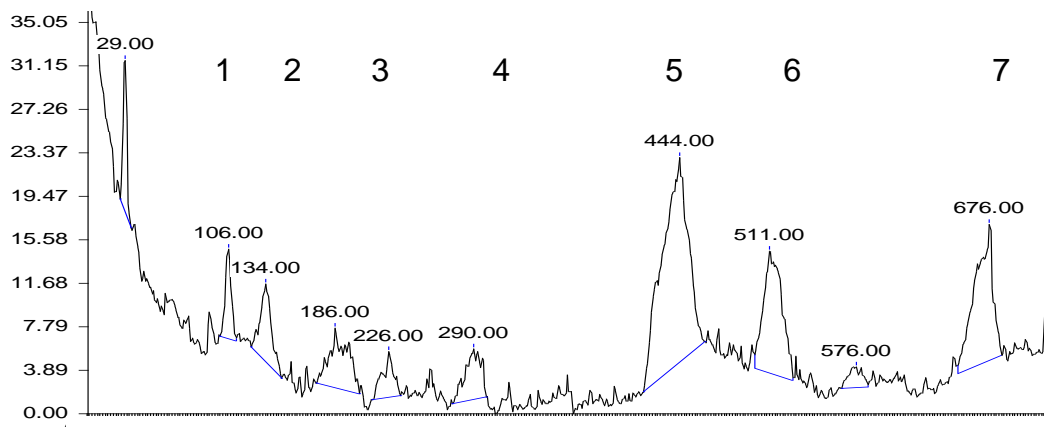
4. Präzision der 1-dimensionalen Gelelektrophorese (1-DE)

4.1 Optimierung der Detektion

Um die unspezifische Hintergrundfärbung und die damit verursachte Basislinienschwankung zu minimieren, wurde auf die Detektion durch VIS-NIR zurückgegriffen [18, 20, 23, 24]. Die mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgele werden mit einem roten Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 685 nm bestrahlt und die Fluoreszenz von den Coomassie-Molekülen bei 700 nm aufgenommen.

Als Vergleich wurde die gleiche Gelbande, die Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116,3 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66,3 kDa), Glutamindehydrogenase (55,4 kDa), Laktatdehydrogenase (36,5 kDa), Carboanhydrase (31,0 kDa) und Trypsininhibitor (21,5 kDa) in den Konzentrationen von 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ – 0,007 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ enthielt, nach der Coomassie-Färbung mit einem NIR-Detektor (Fluorescent Image Analyzer FLA-9000) und einem Weißlicht-Scanner (Power Look III Scanner) eingescannt (Abbildung 4-1). Wie erwartet liefert die NIR-Detektion bei 700 nm für die meisten Proteine ein höheres S/N [21, 22], denn bei dieser Wellenlänge ist die Eigenabsorption der Gelmatrix besonders niedrig (Tabelle 4-1). Die Eindringtiefe des Laserstrahls ins Gewebe nimmt mit zunehmender Wellenlänge zu [113], so können NIR-Strahlen 2 – 5 cm ins Gewebe eindringen und werden daher auch für *in-vivo*-Detektionen eingesetzt [151].

A Signalintensität



B Signalintensität

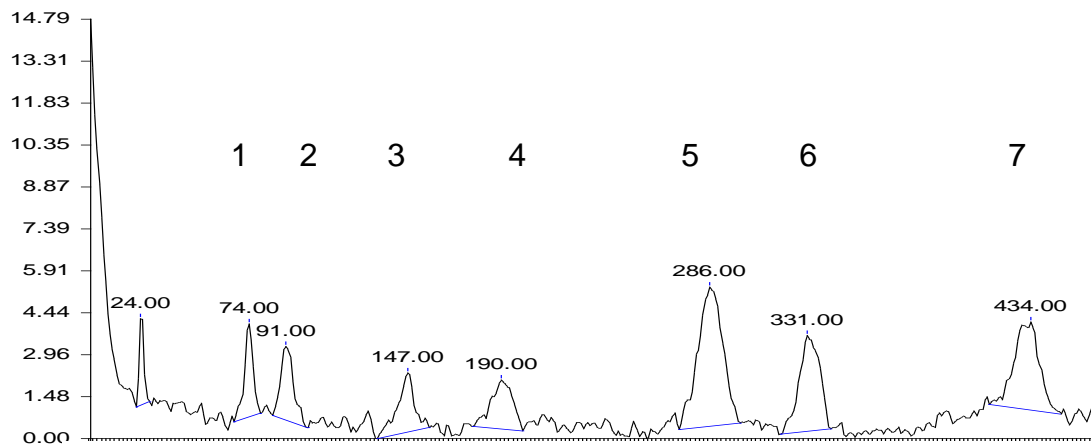


Abbildung 4-1: Die gleiche Gelbande, die Mark12™ Proteinstandardslösung (0,002 µg/µl – 0,007 µg/µl) enthält, wurde nach Coomassiefärbung mit einem Weißlicht-Detektor und einem VIS-NIR-Detektor detektiert, die Detektion mit dem VIS-NIR-Detektor weist ein höheres S/N auf; Nummerierung der Proteine entsprechen Tabelle 4-1 und Abbildung 4-16.

(A) Detektion mit einem Weißlicht-Detektor;

(B) Detektion mit einem VIS-NIR-Detektor.

Tabelle 4-1: Vergleich von S/N der gleichen Gelbande, die mit einem Weißlicht-Detektor und einem VIS-NIR-Detektor vermessen wurde.

| Nr. | Protein | S/N, Detektion mit einem Weißlicht-Detektor | S/N, Detektion mit einem VIS-NIR-Detektor |
|-----|------------------------|---|---|
| 1 | β -Galaktosidase | 5 | 10 |
| 2 | Phosphorylase b | 5 | 8 |
| 3 | BSA | 4 | 7 |
| 4 | Glutamindehydrogenase | 4 | 5 |
| 5 | Laktatdehydrogenase | 16 | 16 |
| 6 | Carboanhydrase | 9 | 13 |
| 7 | Trypsininhibitor | 17 | 12 |

In dieser Arbeit wurden zwei Detektionssysteme von unterschiedlichen Herstellern verwendet, die beide die Detektion bei 700 nm erlauben: das Odyssey Infrarot Imaging System (LiCor Biosciences) und Fluorescent Image Analyzer FLA-9000 (Fujifilm, jetzt erhältlich über GE Healthcare).

Während der Odyssey zwei Laser besitzt und die Signaldetektion bei 700 und 800 nm ermöglicht, ist der FLA-9000 je nach Laser und Filter für unterschiedliche Wellenlängenbereiche, vom UV-Bereich über VIS bis zu NIR, einsetzbar. Ein Scanvorgang eines Minigeles (8,6 x 6 cm) dauert mit dem Odyssey Infrarot Imaging System 10 Minuten, mit dem FLA-9000 ca. 3 Minuten bei vergleichbarer Auflösung. Die maximale Scanfläche beim Odyssey IR Scanner ist 25 x 25 cm, größere Gele lassen sich mit dem FLA-9000 einscannen (40 x 46 cm). Mit beiden Detektoren werden 16-bit tiff-Dateien erzeugt.

Allerdings lassen sich die Laserintensität und die Fokussierung im FLA-9000 im Gegensatz zum Odyssey Infrarot Imaging System nicht individuell einstellen. Aufgrund der automatischen Einstellung der Laserintensität kommt es beim FLA-9000 zu einer hohen Scan-zu-Scan-Variabilität [24], die bis zu 40 % RSD% ausmacht. Daher ist eine Normalisierung auf die Gesamt-Signalintensität oder auf einen internen Standard unverzichtbar. Die Scan-zu-Scan Variabilität wurde minimiert, indem die Intensität jedes Proteins durch die Gesamtintensität aller Proteine einer Bande geteilt wurde. Dieses Normalisierungsverfahren beschränkt sich auf Proben, deren Zusammen-

setzung sich nicht verändert, z. B. in der Qualitätskontrolle von bekannten Proteinen. Bei unbekannten Proben oder Proben, deren Zusammensetzung sich verändert, soll auf die Methode der internen oder externen Standardisierung zurückgegriffen werden [24].

Zunächst wurde die gepoolte Standardabweichung mit Gleichung 49 berechnet:

$$RSD\%_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot RSD\%_1^2 + (n_2 - 1) \cdot RSD\%_2^2 + \dots + (n_m - 1) \cdot RSD\%_m^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_m - m}} \quad (\text{Gleichung 49})$$

Um zu testen, ob die Varianzen beider Detektoren sich signifikant voneinander unterscheiden und ob man die mit beiden Detektionssystemen erhaltenen Ergebnisse zusammenfassen kann, wurde ein F-test durchgeführt mit der Nullhypothese (Gleichung 50):

$$H_0 : \sigma_{\text{Odyssey}}^2 = \sigma_{\text{FLA9000}}^2 \quad (\text{Gleichung 50})$$

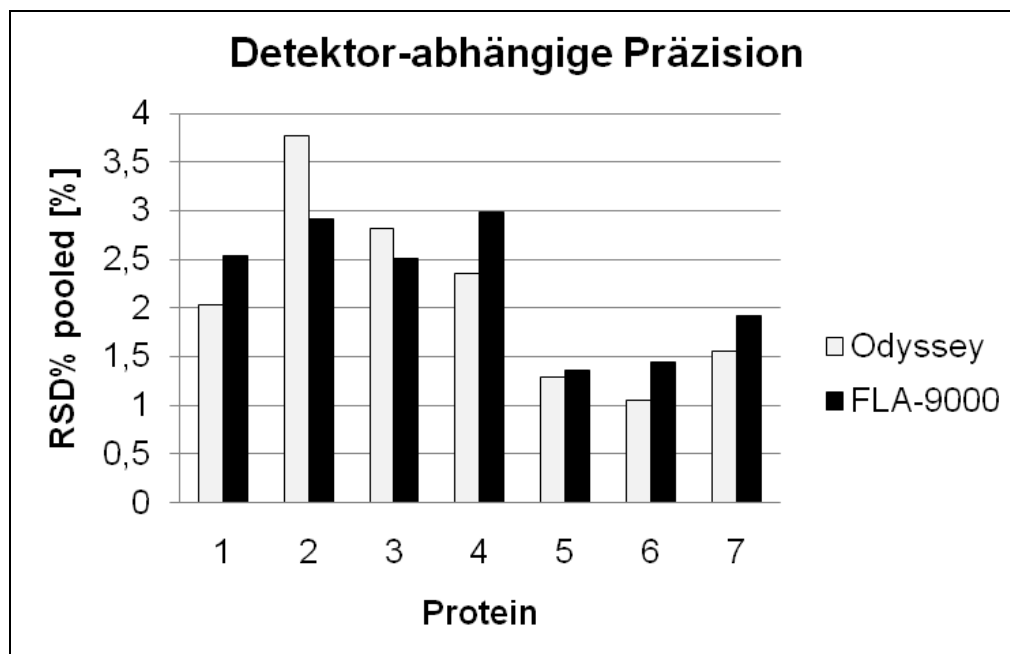


Abbildung 4-2: Die Detektor-abhängige Präzision: Odyssey und FLA-9000, die Gele wurden bei hoher Schüttelgeschwindigkeit (50 min⁻¹) und Raumtemperatur gefärbt und entfärbt; Die Nummerierung der Proteine entsprechen Abbildung 4-16.

Die Nullhypothese konnte unter der Annahme der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ nicht verworfen werden. Unter den untersuchten Bedingungen zeigten die Präzisionen beider Detektoren keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 4-2 und **Tabelle 9-1 A und B**). Beide Detektoren sind zu quantitativen Zwecken für die Gelelektrophorese gut geeignet. Eine Einschränkung gilt für den Fluoreszenzimager FLA-9000, hier ist aufgrund der hohen Scan-zu-Scan-Variabilität eine Normalisierung oder der Einsatz eines internen Standards unbedingt erforderlich.

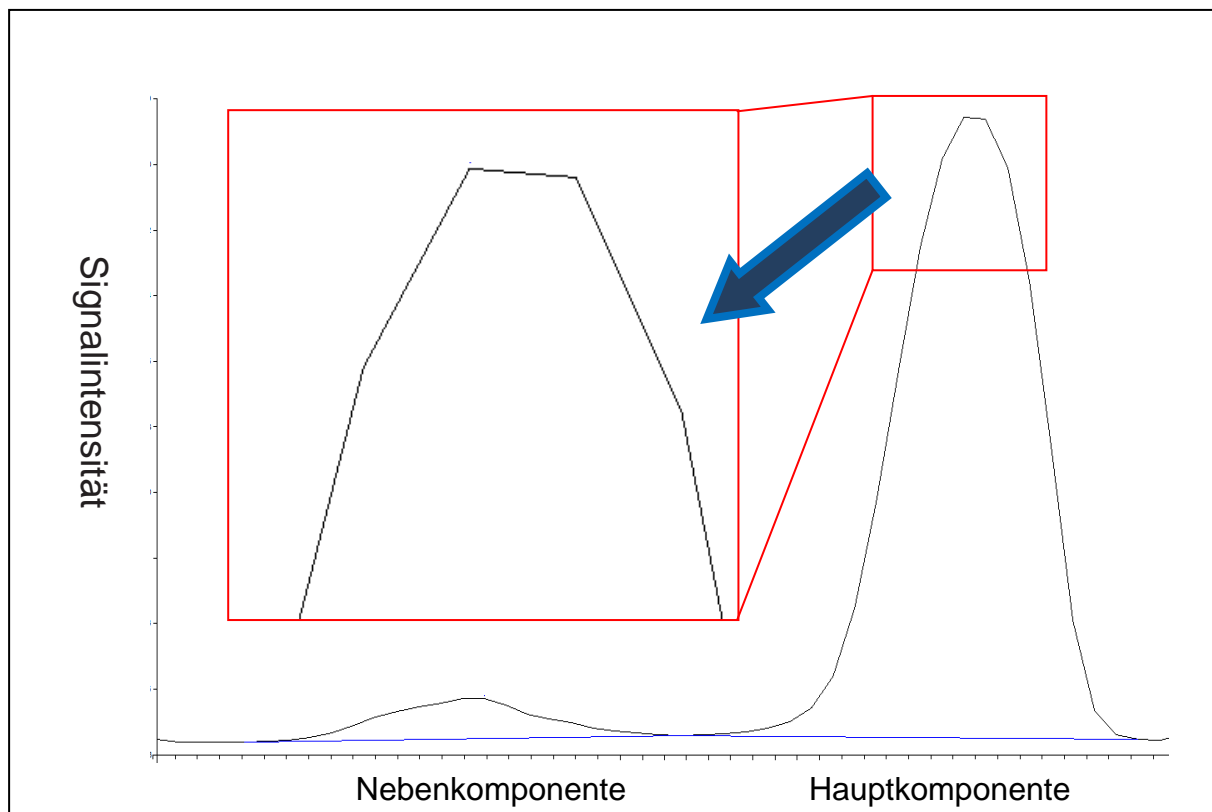


Abbildung 4-3: Eine abgeflachte Peakspitze ist ein Hinweis für eine Übersättigung. Dargestellt ist das Elektropherogramm eines Gelbildes nach Coomassie-Färbung.

Generell muss vor einer quantitativen Bestimmung der lineare Bereich der Färbemethode für das jeweilige Protein ermittelt werden. Außerhalb des linearen Bereiches treten z. B. Übersättigungserscheinungen auf (Abbildung 4-3). In diesem Beispiel war die Konzentration des Proteins zu hoch. Die Gelfläche war bereits komplett mit Coomassie-Molekülen besetzt, es konnten sich keine neuen Coomassie-Moleküle anlagern. Typisch für die Übersättigung ist die abgeflachte Spitze des Signalpeaks. In der Proteomforschung ist die Übersättigung oft unvermeidbar, um auch die Proteine zu detektieren, in niedrigeren Konzentrationen vorliegen. Die so erhaltenen Bilder

lassen jedoch keine weiteren quantitativen Aussagen mehr zu. Auch sollten mit den Gel-Rohdaten keine zusätzlichen Manipulationen wie Tonwertanpassung oder Drehungen ungleich 90° durchgeführt werden, um weitere Variationsquellen zu vermeiden.

4.2 Die Bedeutung von Standardarbeitsanweisungen (SOPs)

Die Gelelektrophoresemethode besteht aus mehreren Arbeitsschritten wie die Probenvorbereitung (PV), Gießen der Gele (GG), Elektrophoreselauf (EL), Färbe- (FP) und Entfärbe-Prozess (EP) etc. Nach dem Fehler-Fortpflanzungs-Gesetz setzt sich die Gesamtvarianz additiv aus den Varianzen der Einzelschritte zusammen. Daher lässt sich die Gesamtstandardabweichung (SD_{Total}) aus Gleichung 51 berechnen:

$$SD_{\text{Total}} = \sqrt{SD_{\text{PV}}^2 + SD_{\text{GG}}^2 + SD_{\text{EL}}^2 + SD_{\text{FP}}^2 + SD_{\text{EP}}^2 \dots} \quad \text{(Gleichung 51)}$$

Um die Präzision der Gelelektrophorese zu verbessern, muss die Varianz eines jeden Einzelschrittes minimal gehalten werden. Der Einsatz von schriftlichen standardisierten Arbeitsanweisungen (Engl.: standard operating procedure, SOP) gewährleistet die gleich bleibende Ausführung sich wiederholender Arbeitsabläufe und hat sich sowohl in klinischen Studien als auch in der Qualitätssicherung der Industrie etabliert [152]. Ebenfalls werden in der Proteomforschung vermehrt einheitliche Protokolle gefordert, um Ergebnisse, die in unterschiedlichen Laboratorien erzielt wurden, besser miteinander vergleichen zu können [153].

Für die quantitative Analyse wurden für jeden Arbeitsschritt der Gelelektrophorese die Parametereinstellungen in einer SOP schriftlich festgehalten (Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5).

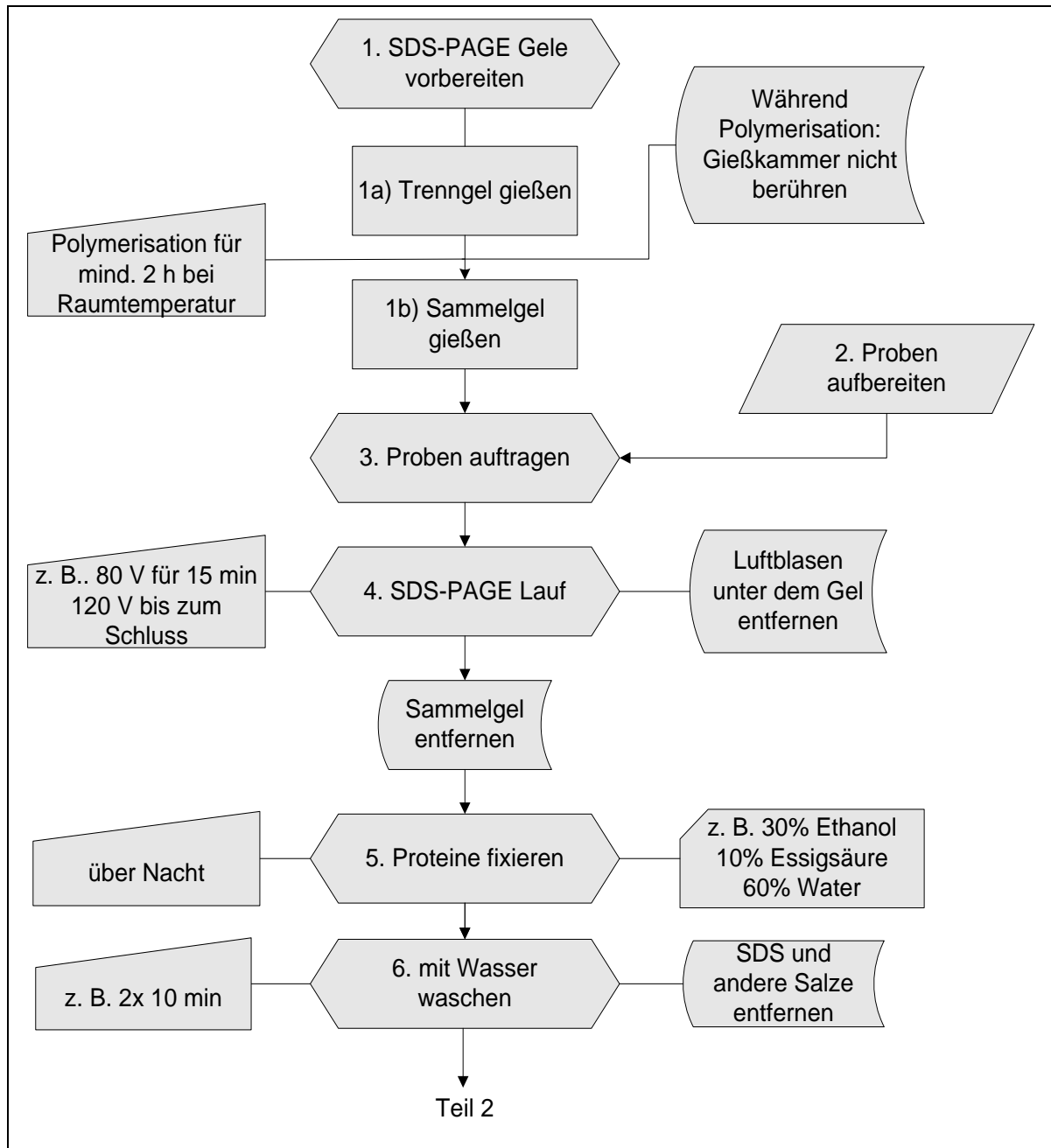


Abbildung 4-4: Beispiel für eine SOP zur Durchführung einer 1-DE, Teil 1.

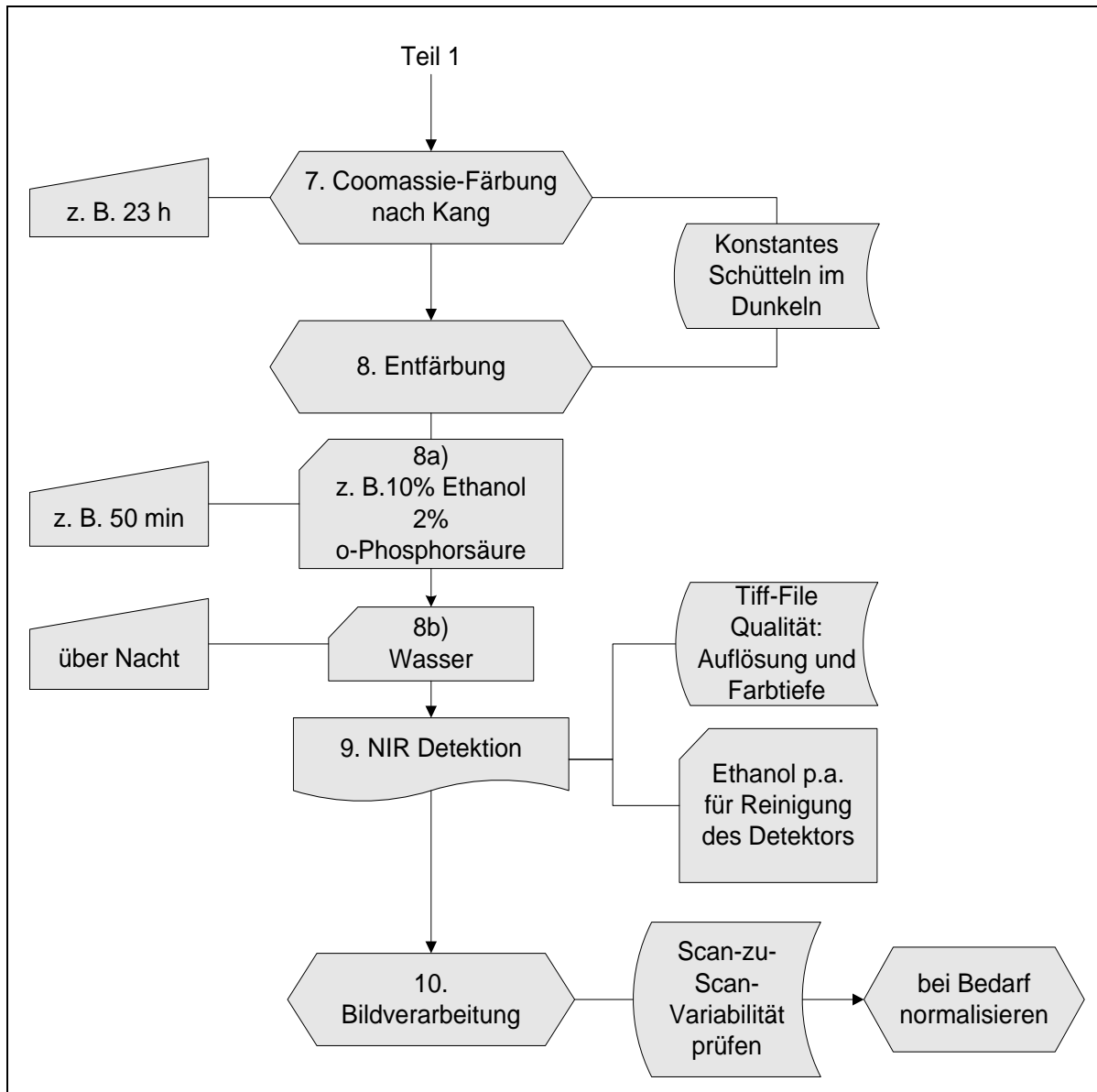


Abbildung 4-5: Beispiel für eine SOP zur Durchführung einer 1-DE, Teil 2.

Da die Hauptfehlerquelle, die unspezifische Hintergrundfärbung, bereits durch die Vis-NIR-Detektion minimiert worden ist, wurde ein Versuchsdesign durchgeführt, um mögliche weitere Fehlerquellen zu identifizieren [20]. Dabei schienen die Färbung und Entfärbung einen wesentlichen Einfluss auf die Präzision zu haben. Daher wurden diese Parameter näher untersucht.

Da die Färbung und Entfärbung meist über mehrere Tage auf einem Horizontalschüttler erfolgt, ist eine Erwärmung der Schüttleroberfläche zu beobachten. Die Erwärmung führt zur Verdunstung der Färbelösung, v. a. des darin enthaltenen Alkohols. Des Weiteren werden in einem Großraumlabor die Horizontalschüttler von meh-

reren Personen für unterschiedliche Versuche verwendet und die Schüttelgeschwindigkeit je nach Bedarf verstellt. Da die Wechselwirkung von Protein mit Coomassie-Molekülen über adsorptive Reaktionen erfolgt, ist ein Einfluss der unterschiedlichen Schüttelstärke auf das Ergebnis zu vermuten. Daher wurden gezielt die zwei Varianzquellen, nämlich Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit, näher analysiert.

Um den Effekt der Temperatur auf die Präzision zu untersuchen (Abbildung 4-6 A), wurden die Gele bei Raumtemperatur oder in einem Kühlraum (4 °C) bei sonst konstant gehaltenen Versuchsbedingungen nach der SOP (Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5) gefärbt und entfärbt. Die Messergebnisse wurden mit F-Tests ausgewertet [24, 118].

Um den Effekt der Schüttelgeschwindigkeit auf die Präzision zu untersuchen (Abbildung 4-6 B), wurden die Gele bei hoher (50 min^{-1}) und bei niedriger Schüttelgeschwindigkeit (30 min^{-1}) bei Raumtemperatur unter ansonsten konstant gehaltenen Versuchsbedingungen gefärbt und entfärbt.

Die F-Tests zeigten keinen signifikanten Effekt der Temperatur auf die Präzision (Abbildung 4-6 A und Tabelle 9-2 A). Dagegen zeigte die Schüttelgeschwindigkeit bei zwei der sieben Proteine, nämlich β -Galaktosidase und Laktatdehydrogenase, einen signifikanten Effekt auf die Präzision (Abbildung 4-6 B und Tabelle 9-2 B).

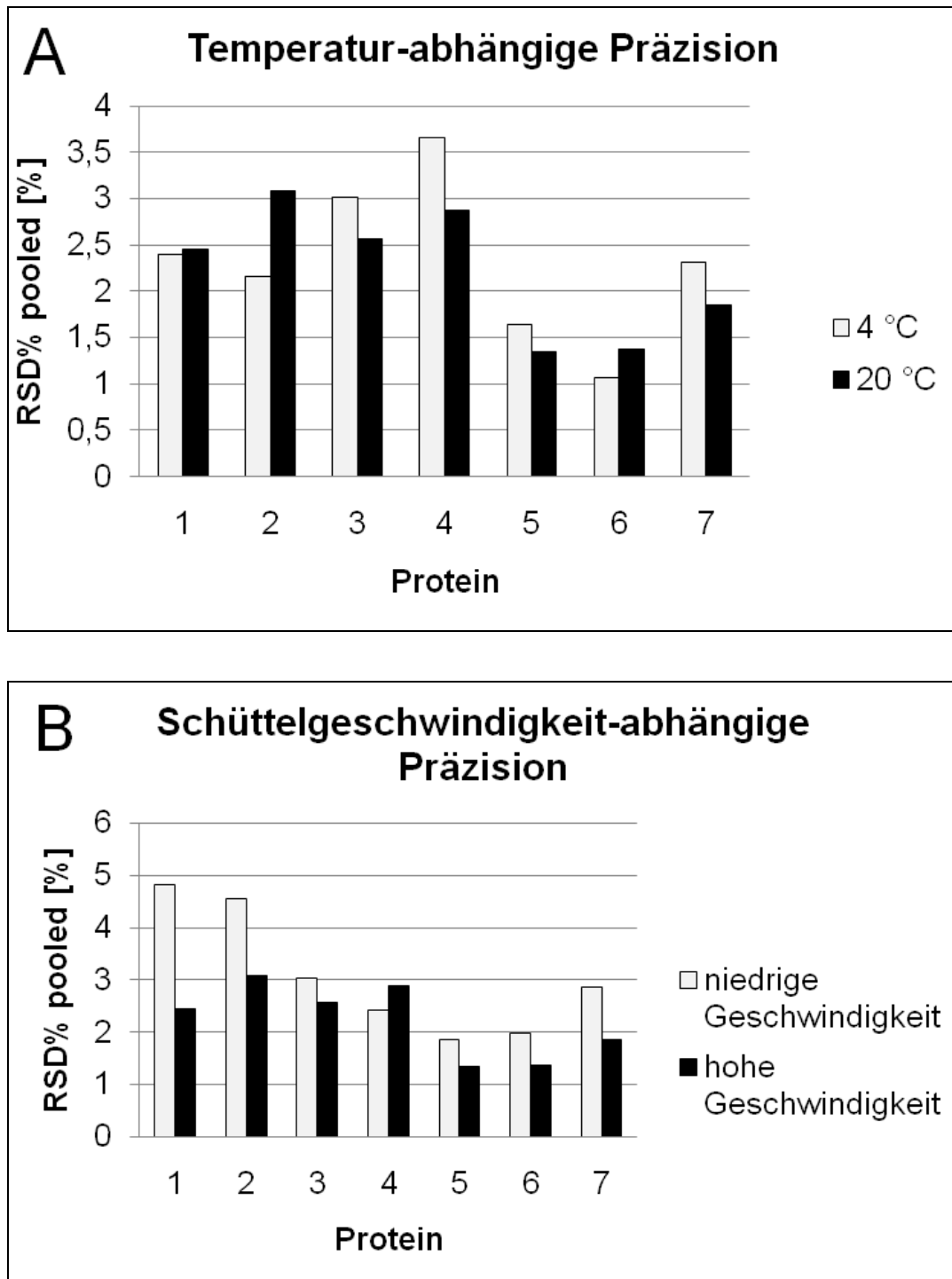


Abbildung 4-6:

(A) Temperatur-abhängige Präzision: Färbung und Entfärbung bei 4 °C oder Raumtemperatur bei konstant hoher Schüttelgeschwindigkeit;

(B) Schüttelgeschwindigkeitsabhängige Färbung und Entfärbung bei hoher (50 min^{-1}) oder niedriger (30 min^{-1}) Schüttelgeschwindigkeit bei Raumtemperatur;

Nummerierung der Proteine entsprechen der Abbildung 4-16.

4.3 Varianzanalyse der Schüttelgeschwindigkeitsabhängigen Präzision

Die Präzisionsdaten von den Gelen, deren Färbung und Entfärbung bei hoher Schüttelgeschwindigkeit und Raumtemperatur erfolgten, wurden mittels der Varianzanalyse [10] untersucht (Tabelle 9-3). Es wurde zwischen drei Varianzen unterschieden: die Bande-zu-Bande-Varianz $\hat{\sigma}_{\text{lanes}}^2$, die Gel-zu-Gel-Varianz $\hat{\sigma}_{\text{gels}}^2$ und die Tag-zu-Tag-Varianz $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$. Eine Skizze der Versuchsanordnung ist in Abbildung 9-1 zu finden. Die gepoolte Bande-zu-Bande-Varianz $\hat{\sigma}_{\text{lanes}}^2$ beruht auf einem hohen Freiheitsgrad $df = 128$ und dementsprechend hohem Vertrauensbereich.

Die zu untersuchende Fragestellung war der Anteil jeder Teilvarianz an der Gesamtvarianz und die zugehörigen effektiven Freiheitsgrade. Wie bereits in Kapitel 2.2.1.1 vorgestellt, setzt sich die Gesamtvarianz nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus der Summe der Einzelvarianzen zusammen (Gleichung 52).

$$\hat{\sigma}_{\text{total}}^2 = \hat{\sigma}_{\text{lanes}}^2 + \hat{\sigma}_{\text{gels}}^2 + \hat{\sigma}_{\text{days}}^2 \quad \text{Gleichung 52)}$$

| | |
|---------------------------------|------------------------|
| $\hat{\sigma}_{\text{total}}^2$ | Gesamtvarianz |
| $\hat{\sigma}_{\text{lanes}}^2$ | Bande-zu-Bande-Varianz |
| $\hat{\sigma}_{\text{gels}}^2$ | Gel-zu-Gel-Varianz |
| $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$ | Tag-zu-Tag-Varianz |

Eine detaillierte Beschreibung der ANOVA mit einem hierarchischen Versuchsdesign ist in [10] zu finden. Die gepoolte $\hat{\sigma}_{\text{lanes}}^2$ lässt sich mit Gleichung 53 berechnen:

$$\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot \hat{\sigma}_1^2 + (n_2 - 1) \cdot \hat{\sigma}_2^2 + \dots + (n_m - 1) \cdot \hat{\sigma}_m^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_j - m} \quad \text{(Gleichung 53)}$$

$\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2$ gepoolte Bande-zu-Bande-Varianz

n Anzahl der Banden

m Anzahl der Gele

Die Berechnung von $\hat{\sigma}_{\text{gels}}^2$ ist etwas komplizierter, zunächst wird eine andere Größe V_{gels} berechnet (Gleichung 54):

$$V_{\text{gelspooled}} = \frac{(m_1 - 1) \cdot V_{\text{gel},1} + (m_2 - 1) \cdot V_{\text{gel},2} + \dots + (m_j - 1) \cdot V_{\text{gel},j}}{m_1 + m_2 + \dots + m_j - j} \quad \text{(Gleichung 54)}$$

$$\text{mit } V_{\text{gels}} = \frac{\sum (\bar{x}_{\text{lanes},m} - \bar{x}_{\text{gels}})^2}{m - 1}$$

$V_{\text{gels,pooled}}$ gepoolte Gel-zu-Gel-Gesamtvarianz

m Anzahl der Gele

j Anzahl der Tage

V_{gels} Varianz zwischen den Gelen

$\bar{x}_{\text{lanes},m}$ Mittelwert der Banden auf Gel m

\bar{x}_{gels} Mittelwert der Gele

Zu beachten ist, dass in V_{gels} auch die Varianz $\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2$ enthalten ist. Um $\hat{\sigma}_{\text{gelspooled}}^2$ zu berechnen, muss diese abgezogen werden (Gleichung 55):

$$\hat{\sigma}_{\text{gelspooled}}^2 = V_{\text{gelspooled}} - \frac{\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2}{n} \quad \text{(Gleichung 55)}$$

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| $\hat{\sigma}_{\text{gelspooled}}^2$ | gepoolte Gel-zu-Gel-Varianz |
| $V_{\text{gelspooled}}$ | gepoolte Gel-zu-Gel-Gesamtvarianz |
| $\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2$ | gepoolte Bande-zu-Bande-Varianz |
| n | Anzahl der Banden |

Entsprechend lässt sich $\hat{\sigma}_{\text{days,pooled}}^2$ (Gleichung 57) aus $V_{\text{days,pooled}}$ (Gleichung 56) durch Abzug der Anteile von $\hat{\sigma}_{\text{gelspooled}}^2$ (Gleichung 55) und $\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2$ (Gleichung 53) berechnen.

$$V_{\text{days,pooled}} = V_{\text{days}} = \frac{\sum (\bar{x}_{\text{gels},j} - \bar{x}_{\text{days}})^2}{j-1} \quad \text{(Gleichung 56)}$$

$$\hat{\sigma}_{\text{days,pooled}}^2 = V_{\text{days,pooled}} - \frac{\hat{\sigma}_{\text{gelspooled}}^2}{m} - \frac{\hat{\sigma}_{\text{lanespooled}}^2}{m \cdot n} \quad \text{(Gleichung 57)}$$

Der effektive Freiheitsgrad der Gesamtvarianz ist abhängig von den Größen der Einzelvarianzen und deren Freiheitsgrade, sie lässt sich nach der Welch-Satterthwaite-Formel berechnen (Gleichung 58) [154]:

$$df_{\text{eff}} = \frac{\hat{\sigma}_{\text{total}}^4}{\frac{\hat{\sigma}_{\text{lanes}}^4}{df_{\text{lanes}}} + \frac{\hat{\sigma}_{\text{gels}}^4}{df_{\text{gels}}} + \frac{\hat{\sigma}_{\text{days}}^4}{df_{\text{days}}}} \quad \text{(Gleichung 58)}$$

| | |
|---------------------|------------------------------|
| df_{eff} | effektiver Freiheitsgrad |
| df_{lanes} | Freiheitsgrad Bande-zu-Bande |
| df_{gels} | Freiheitsgrad Gel-zu-Gel |
| df_{days} | Freiheitsgrad Tag-zu-Tag |

Die berechneten df_{eff} –Werte reichen von 4 bis 36. Je größer der Anteil $\hat{\sigma}_{\text{days,pooled}}^2$ an $\hat{\sigma}_{\text{total}}^2$, desto kleiner werden df_{eff} . Diese Freiheitsgrade sind trotzdem noch hoch genug, um Aussagen mit hoher statistischer Sicherheit zu erhalten.

Nach der Analyse der Gesamtvarianz nach Gleichung und Umrechnung in prozentuale Anteile stellte sich heraus, dass $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$ die dominierende Varianzquelle für die untersuchten 7 Proteine ist [24]. Rund 26 – 89 % der Gesamtvarianz ist auf diese Varianzquelle zurückzuführen (Abbildung 4-7 A und Tabelle 9-3). Die $\hat{\sigma}_{\text{gels}}^2$ war zwar auch für manche Proteine entscheidend, machten aber einen viel kleineren Anteil aus (3 – 37 %).

Nun galt es mögliche Varianzquellen zu identifizieren, die die hohe Tag-zu-Tag-Streuung $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$ verursachen könnten. Mögliche Quellen ist der Einsatz unterschiedlicher Reagenzien und Temperaturschwankungen. Da der Temperatureinfluss während des Färbens und Entfärbens bereits untersucht worden war und dieser keinen signifikanten Effekt auf die Präzision zeigte (Tabelle 9-2 A), wurde dieser nicht als Hauptfehlerquelle angesehen.

Die Färbelösung wurde unter strenger Befolgung einer Herstellungsvorschrift zubereitet. Jedoch wurden für die Reproduzierbarkeitsversuche drei verschiedene Chargen verwendet. Um zu prüfen, ob die Lösungen unterschiedlicher Chargen die Gesamtvarianz, im Genaueren den Anteil der $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$ erhöht, wurde die ANOVA ein weiteres Mal unter Berücksichtigung lediglich der 12 Gele durchgeführt, die mit der gleichen Charge Färbelösung behandelt wurden. Die effektiven Freiheitsgrade wurden neu kalkuliert (Abbildung 4-7 B und Tabelle 9-4).

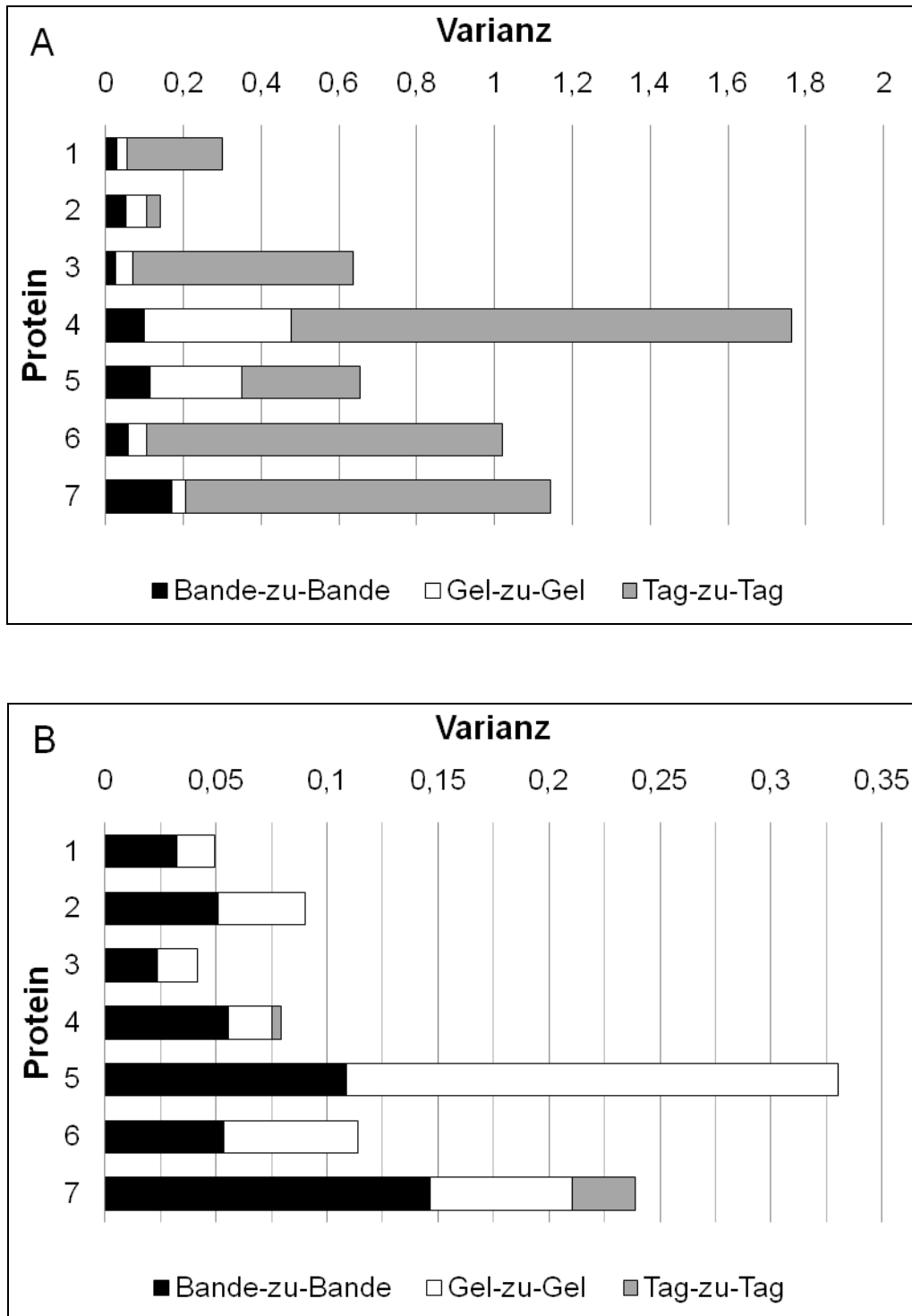


Abbildung 4-7: ANOVA der Gesamtvarianz und Anzahl berücksichtigter Gele, Färbung und Entfärbung bei hoher Schüttelgeschwindigkeit und Raumtemperatur;
(A) ANOVA unter Berücksichtigung aller Daten, 20 Gele;
(B) ANOVA, nur die Gele, die mit der gleichen Charge CCB Färbelösung gefärbt wurden, wurden berücksichtigt, 12 Gele. Die Nummern entsprechen den Proteinen aus Abbildung 4-15. Die unterschiedliche Achsenskalierung der Graphen ist zu beachten.

So konnte eine drastische Senkung des Anteils von $\hat{\sigma}_{\text{days}}^2$ an der Gesamtvarianz beobachtet werden, dieser betrug nur noch 0 – 12 % mit einem df_{eff} von 17 bis 74. Die totale RSD% wurde dadurch von 3 – 13 % auf 2 – 4 % gesenkt. Dies zeigte, dass die Färbelösung eine entscheidende Bedeutung auf die Gesamtvariabilität hat. Also sollte eine Färbelösung möglichst in großen Mengen hergestellt werden. Um die Präzision zu erhöhen soll für eine Versuchsserie nach Möglichkeit die gleiche Charge der Färbelösung verwendet werden.

4.4 Die Coomassie-Färbelösung: Varianz der Chargen

Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und der niedrigen Materialkosten ist die Coomassie-Färbung die am häufigsten eingesetzte Färbemethode für Gele [18, 83]. Von den unterschiedlichen Coomassie-Färbeprotokollen hat die kolloidale Coomassie-Färbemethode die niedrigste Detektionsgrenze und die beste Reproduzierbarkeit [85]. Darum wurde die kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang [90, 92] für die Ermittlung der Präzision der quantitativen Gelelektrophorese verwendet.

Bei der Herstellung der kolloidalen Färbelösung müssen die Reagenzien in einer bestimmten Reihenfolge gelöst werden, um eine gleichbleibende Qualität der Färbelösung zu erreichen. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, sollte die Färbelösung in großen Chargen hergestellt werden. Das gleiche gilt auch für andere für die Gelelektrophorese verwendete Lösungen, wie Gel-Medien oder Laufpuffer [17]. Manche Forscher versuchen auf die flüchtigen Bestandteile, wie den Alkohol und die Essigsäure, zu verzichten [155].

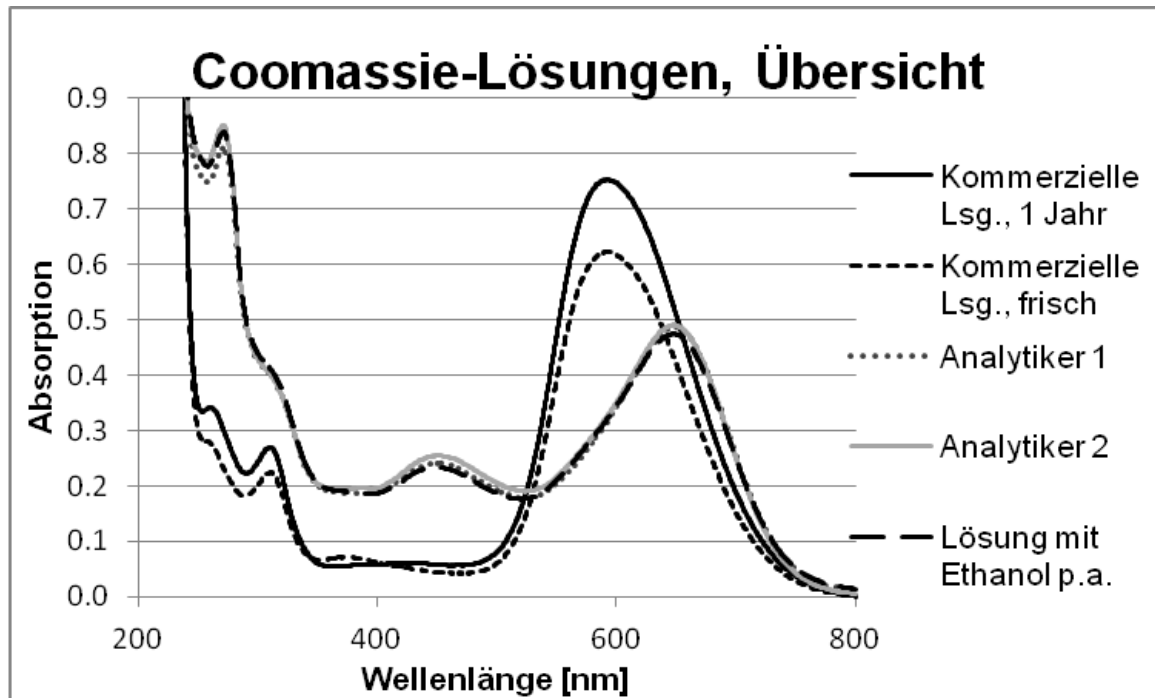


Abbildung 4-8: UV-VIS-Absorptionsspektren von unterschiedlichen Chargen von Coomassie-Lösungen.

Um zu untersuchen, wie sich verschiedene Lösungsansätze, die zwar nach der gleichen Anweisung [92], aber durch unterschiedliche Analytiker oder mit unterschiedlicher Lösungsmittelqualität, hergestellt wurden sich voneinander unterschieden, wurden UV-VIS-Absorptionsspektren aufgenommen. Neben den selbsthergestellten Färbelösungen wurden auch kommerzielle Lösungen (frisch und 1 Jahr alt) untersucht.

Zu sehen sind im Absorptionsspektrum (Abbildung 4-8) für die selbsthergestellte Lösung nach Kang [90] die protonierte Form des Coomassie-Moleküls mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm und die neutrale Form mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm [88, 91]. Die unterschiedlichen Chargen der selbsthergestellten Coomassie-Lösungen unterschieden sich nur wenig. Daher muss die Variabilität der einzelnen Chargen auf unterschiedliche Chemikalienchargen zurückzuführen sein.

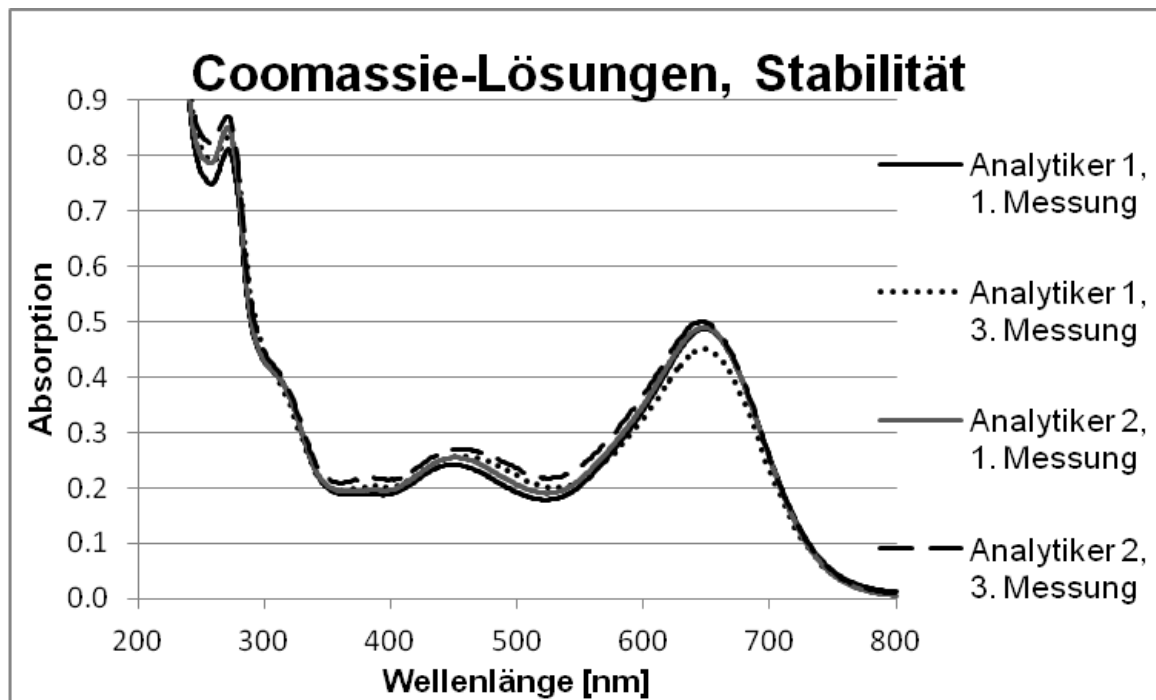


Abbildung 4-9: Coomassie-Lösungen und die Veränderung ihrer UV-VIS-Spektren mit der Zeit, Vergleich der selbsthergestellten Lösungen mit technischem Ethanol; Der Zeitraum zwischen der ersten und der dritten Messung betrug 5 Monate.

Die kommerzielle Coomassie-Lösung, SimplyBlue™ SafeStain, enthält keine Säure, daher ist nur ein Absorptionsmaximum bei 590 nm zu sehen, das der anionischen Form zuzuordnen ist [91]. Zur Untersuchung der Haltbarkeit der Färbelösung wurden eine frische Färbelösung und eine 1 Jahr alte Färbelösung vermessen (Abbildung 4-8), vor der Vermessung wurden sie jeweils 2 zu 5 verdünnt. Dabei wies die ältere Lösung eine höhere Absorption auf. Dies lässt sich wahrscheinlich auf Verdunstungsprozesse des Lösungsmittels und damit eine Aufkonzentrierung des Farbstoffes zurückführen.

Die Absorptionsmessungen wurden über einen Zeitraum von 5 Monaten durchgeführt, um die Haltbarkeit der selbsthergestellten Lösungen zu untersuchen. Zur Übersicht wurde jeweils das Spektrum von der ersten und der letzten Messung dargestellt (Abbildung 4-9). Die Absorptionsspektren unterscheiden sich nicht signifikant. Die Absorption bei 650 nm nimmt leicht ab, während die Absorption bei 450 nm zunimmt. Die Coomassie-Lösung scheint schwach sauer zu sein. Filtrierte Lösungen wurden vermessen, eine Veränderung der Kolloide konnte also nicht ausgeschlossen wer-

den. Am UV-VIS-Spektrum der kommerziellen Lösung ist über die 5 Monate keine Veränderung festzustellen (Abbildung 4-10).

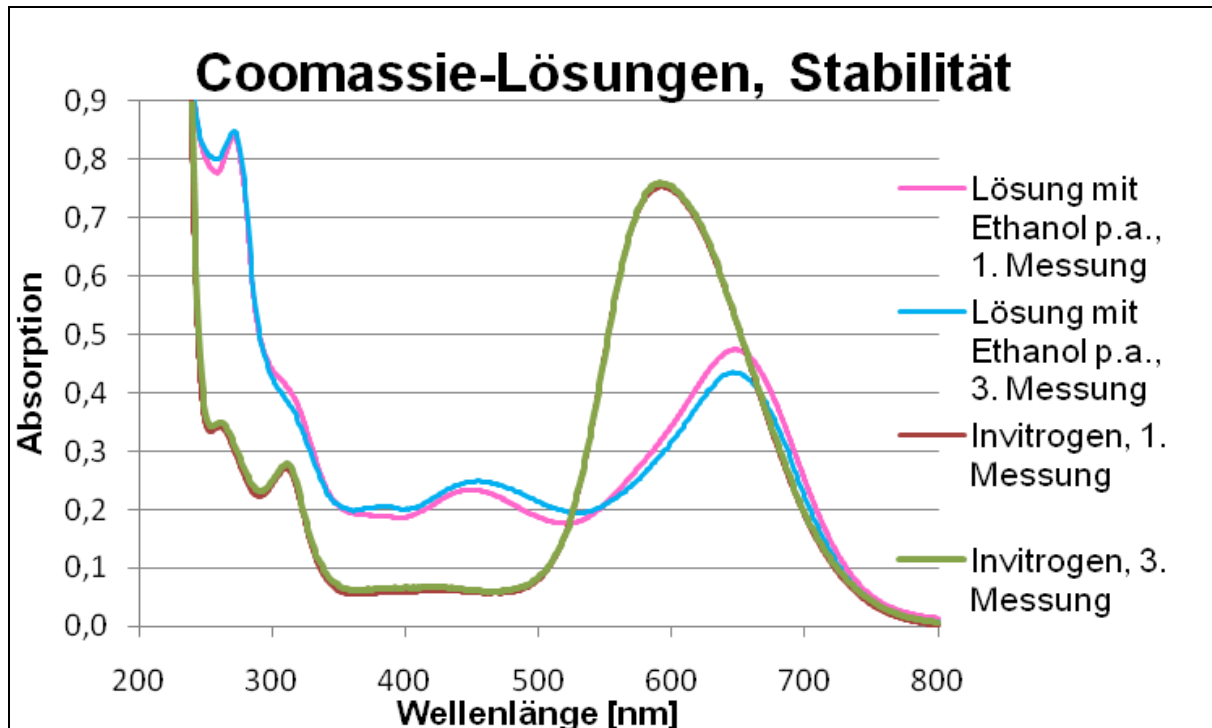


Abbildung 4-10: Coomassie-Lösungen und die Veränderung ihrer UV-VIS-Spektren mit der Zeit, Vergleich der selbsthergestellten Lösungen mit Ethanol p. a.; Der Zeitraum zwischen der ersten und der dritten Messung betrug 5 Monate.

4.4 Methodenvalidierung

4.4.1 Linearität

Die Linearität der mit CCB-Lösung nach Kang [90] gefärbten Standardproteine wurde durch serielle Verdünnung anhand von 10 Konzentrationen (0,002 – 0,09 µg/µl) untersucht. Das Bestimmtheitsmaß war für alle untersuchten Proteine größer gleich 0,9971 (Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12).

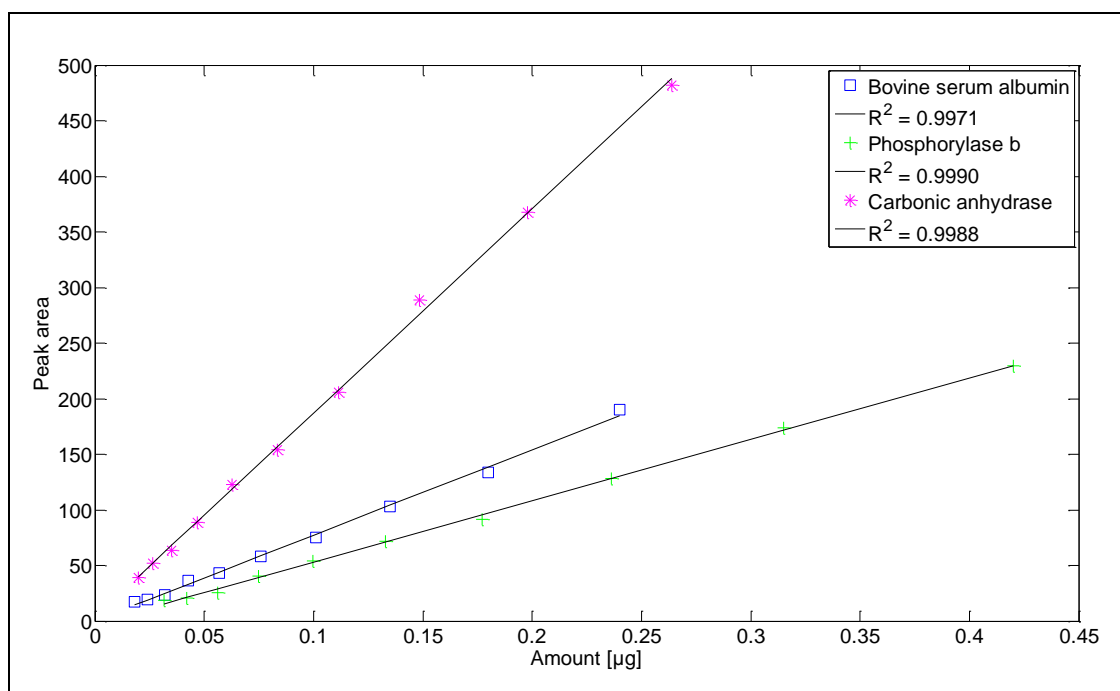


Abbildung 4-11: Linearität von Mark12™ Unstained Standard, Teil 1.

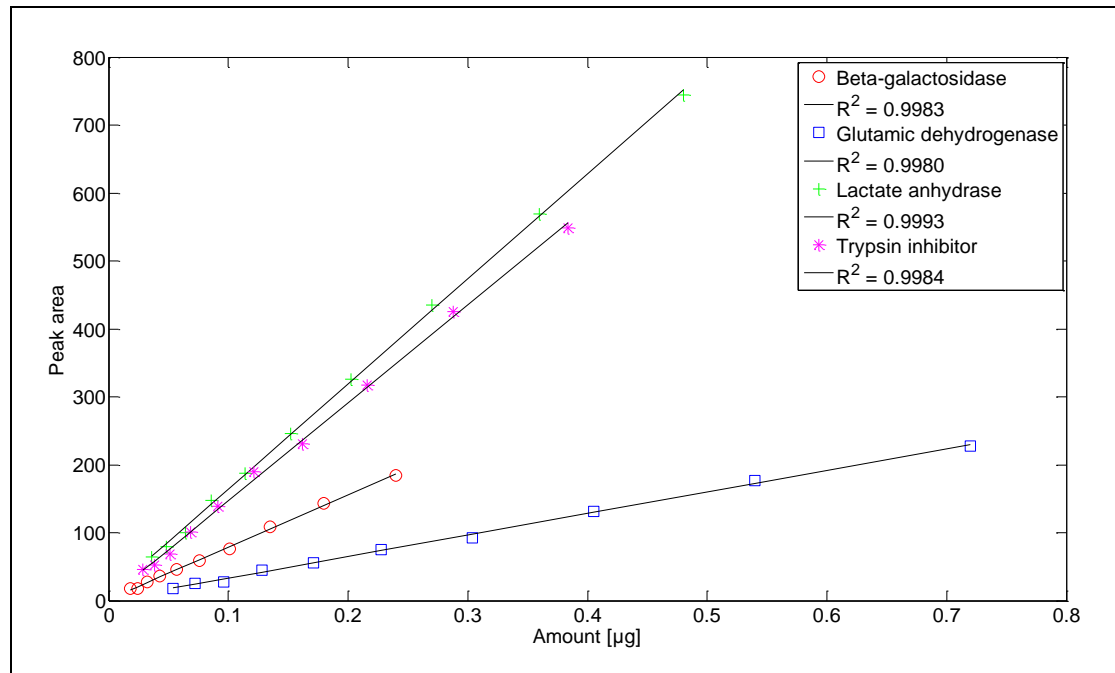


Abbildung 4-12: Linearität von Mark12™ Unstained Standard, Teil 2.

Konfidenzintervalle mit $1-\alpha = 0,95$ für die Linearitätsgeraden der Proteine, die die zwei kleinsten Bestimmtheitsmaße R^2 aufweisen, werden in den Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14 dargestellt.

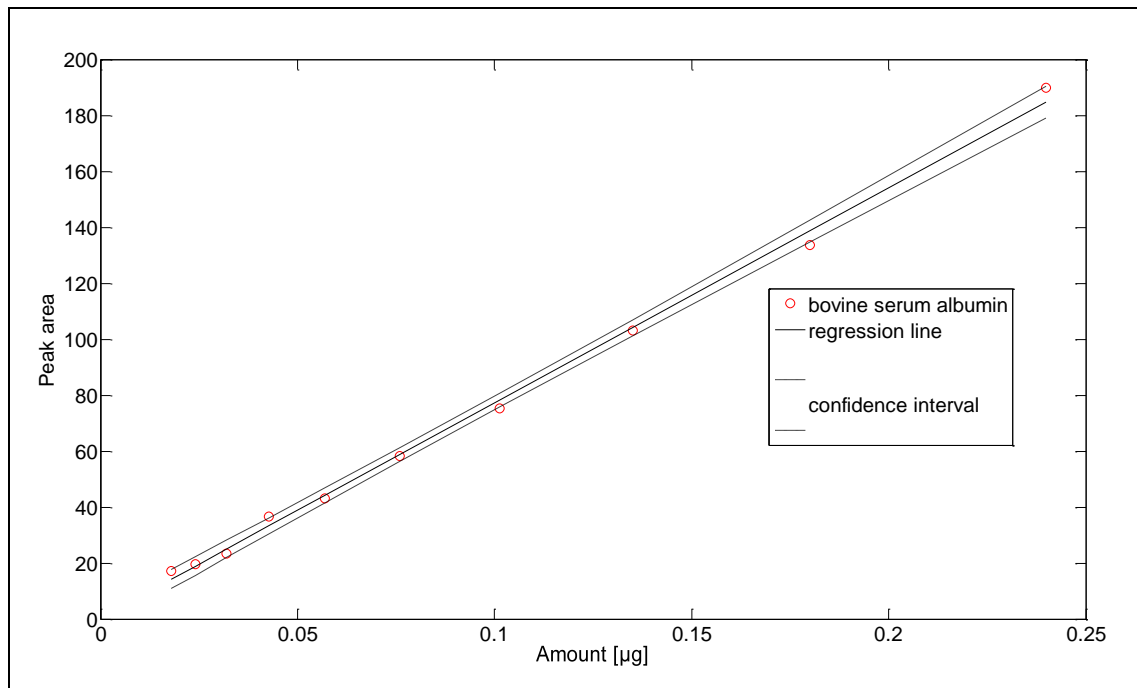


Abbildung 4-13: Regressionsplot für BSA mit 95 % Konfidenzintervall, $R^2 = 0,9971$.

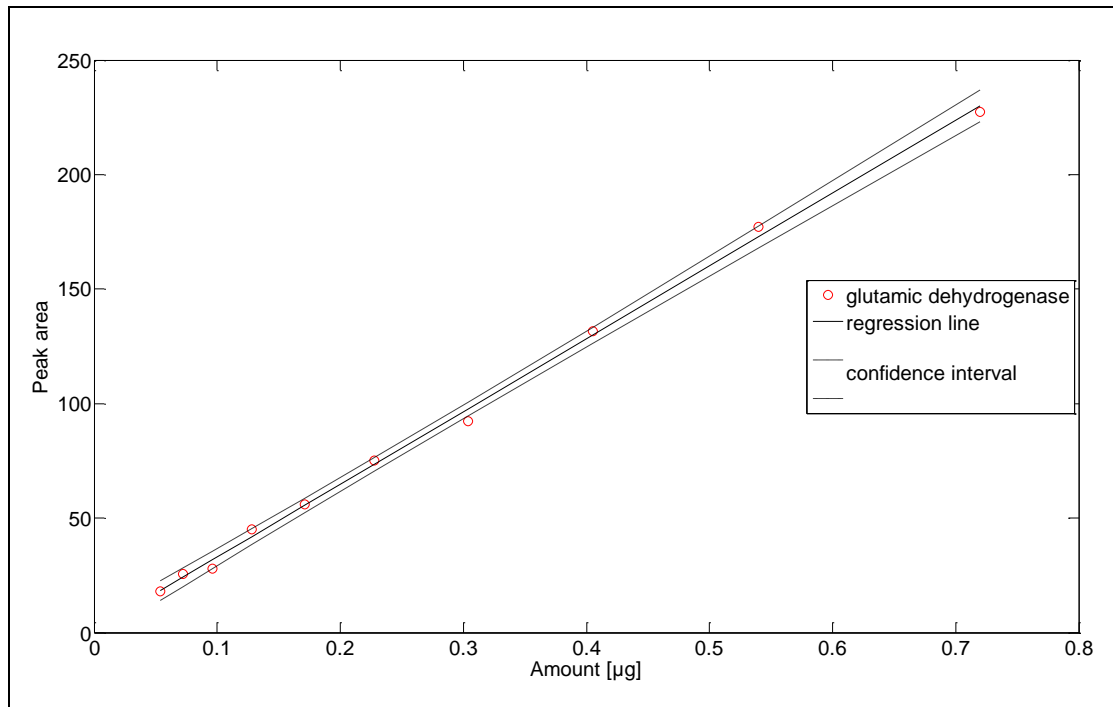


Abbildung 4-14: Regressionsplot für Glutamindehydrogenase mit 95 % Konfidenzintervall, $R^2 = 0,9980$.

4.4.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Staubkörner und Papierflusen verursachen im NIR-Bereich starke Störsignale. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) zu steigern und damit die mittlere relative Standardabweichung zu senken und die Präzision zu erhöhen, wurden für die Reproduzierbarkeits-Versuche höhere Konzentrationen (0,02 – 0,06 µg/µl) aus dem linearen Bereich gewählt [117, 156]. Für die folgende Studie war das S/N für alle Proteine größer gleich 26 (Abbildung 4-15). Damit waren die Voraussetzungen erfüllt, auch die kleineren Varianzquellen der quantitativen Gelelektrophorese zu erforschen [20].

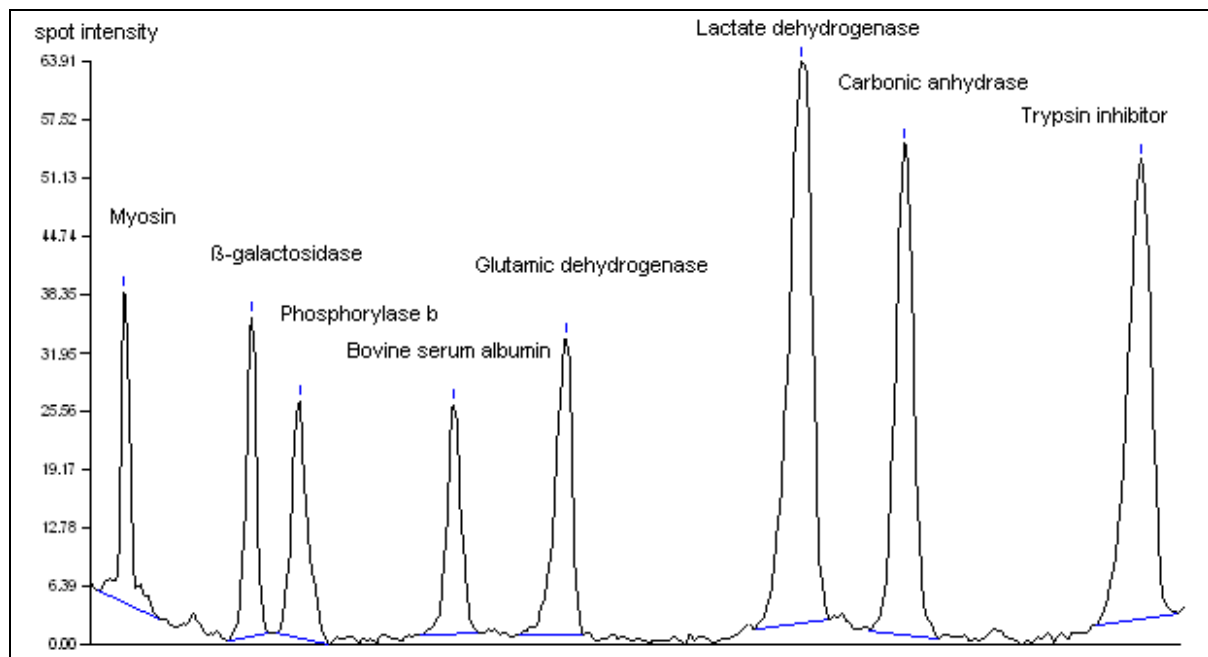


Abbildung 4-15: Repräsentatives Elektropherogramm der untersuchten Proteinmischung Mark12™ Unstained Standard.

4.4.3 Reproduzierbarkeit

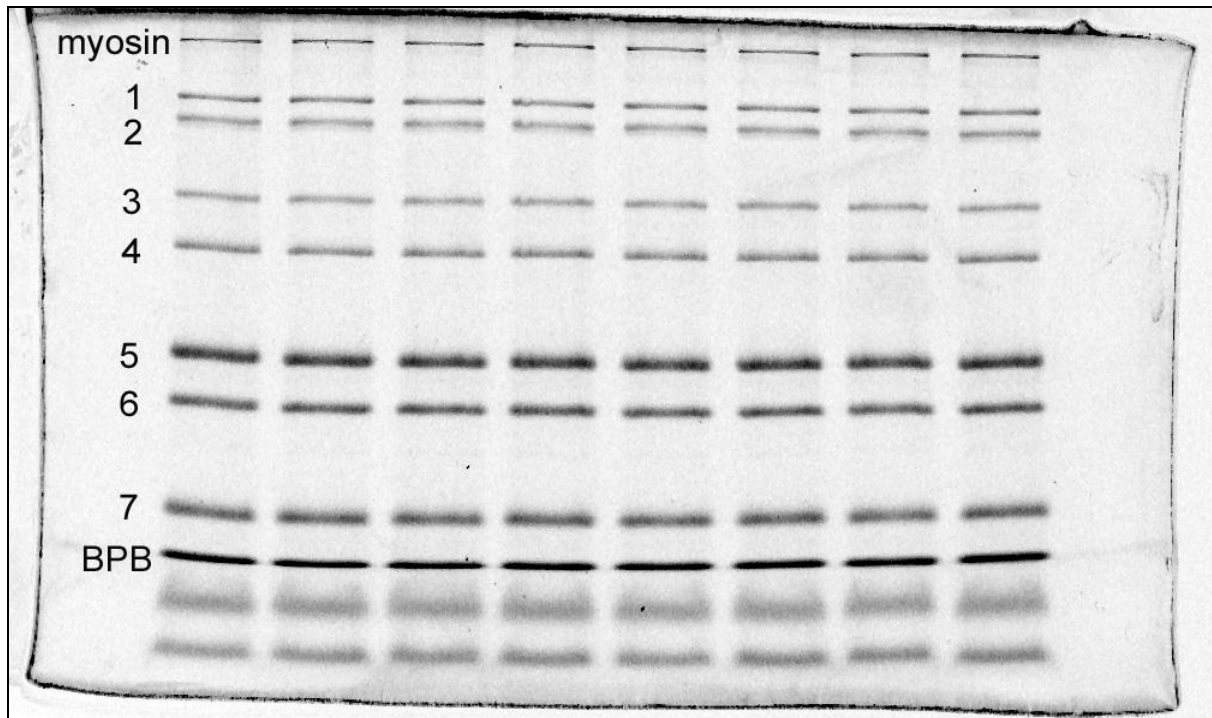


Abbildung 4-16: Proteine mit Nummerierung (untersuchte Konzentration; M_r):

1. β -Galaktosidase (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 116,3 kDa),
2. Phosphorylase b (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 97,4 kDa),
3. Bovines Serumalbumin (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 66,3 kDa),
4. Glutamindehydrogenase (0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 55,4 kDa),
5. Laktatdehydrogenase (0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 36,5 kDa),
6. Carboanhydrase (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 31,0 kDa),
7. Trypsininhibitor (0,03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 21,5 kDa).

Myosin und die restlichen Proteine vor der Bromphenolblaubande (BPB) wurden nicht berücksichtigt, weil sie den linearen Bereich des Geles überschritten (Abbildung 8-1).

Da die RSD% aller Serien gleicher Größenordnung waren, ist es erlaubt, die totale relative Standardabweichung mit der gepoolten RSD% darzustellen (Gleichung 59) [20, 157, 158].

$$\text{RSD\%}_{\text{pooled}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot \text{RSD\%}_1^2 + (n_2 - 1) \cdot \text{RSD\%}_2^2 + \dots + (n_m - 1) \cdot \text{RSD\%}_m^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_m - m}} \quad (\text{Gleichung 59})$$

$\text{RSD\%}_{\text{pooled}}$ gepoolte prozentuale relative Standardabweichung [%]
 n_i Anzahl der Banden auf dem m-ten Gel
 RSD\%_m RSD% auf dem m-ten Gel
 m Anzahl der Gele

Auf jedem Gel wurden mindestens 6 Proteinbanden aufgetragen und das Gel wurde dreimal gescannt, d. h. für die Berechnung eines $\text{RSD\%}_{\text{pooled}}$ -Wertes für ein Protein, das auf 16 Gelen vermessen wurde, wurden mindestens 288 Elektropherogramme analysiert. Die gepoolten RSD% betrugen für die analysierten 7 Proteine 1,2 – 3,1 % [24].

4.4.4 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze

Da die Affinität zu dem CCB Farbstoff von Protein zu Protein variiert, so ist auch die Bestimmungsgrenze und die Detektionsgrenze für jedes Protein einzeln zu bestimmen. Für die Bestimmungsgrenze gilt $S/N \geq 3$. Dieser Wert wurde bei der stärksten Verdünnung des Linearitätstests für alle Proteine überschritten (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-2: Bestimmungsgrenze für die Proteine aus Mark12™ Unstained Standard.

| Protein | | Bestimmungsgrenze [ng] | Detektionsgrenze [ng] |
|---------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 1 | β-Galaktosidase | 24 | < 18 |
| 2 | Phosphorylase b | 56 | < 32 |
| 3 | BSA | 32 | < 18 |
| 4 | Glutamindehydrogenase | 96 | < 54 |
| 5 | Laktatdehydrogenase | 36 | < 36 |
| 6 | Carboanhydrase | 26 | < 20 |
| 7 | Trypsininhibitor | 38 | < 29 |

4.5 Zusammenfassung

Diese Versuche haben gezeigt, dass die quantitative Analyse mittels 1-DE in Kombination mit CCB-gefärbten Gelen und Vis-NIR-Detektion möglich ist. Ergebnisse mit hoher Präzision, nämlich gepoolte RSD% von 1,2 – 3,1 %, wurden erzielt [24].

Die Einhaltung einer ausführlichen SOP [17, 153] und damit die Kontrolle über möglichst alle Parameter eines jeden Teilprozesses, ab der Herstellung der Gele bis hin zur Detektion, ist sehr wichtig, um präzise Ergebnisse zu erhalten. Es wurde gezeigt, dass nicht die konkreten Werte der Einstellungen, sondern die Konstanzhaltung der Parameter von hoher Relevanz ist. Darüber hinaus wurde die gute Einsetzbarkeit zweier Vis-NIR-Detektoren bestätigt und mögliche Einschränkungen, z. B. die Normalisierung beim FLA-9000, erläutert.

Eine Varianzkomponentenanalyse brachte hervor, dass die Tag-zu-Tag-Varianz den größten Anteil an der Gesamtvarianz darstellte. Durch eine Analyse der möglichen Varianzquellen, die erst durch die genaue Einhaltung der SOP (Abbildung 4-4 und Abbildung 4-5) möglich war, wurde der Unterschied von CCB-Färbelösung von Charge zu Charge als Hauptvarianzquelle identifiziert. Vermutlich ist der Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel-Chargen, z. B. des technischen Ethanol der Grund für die Tag-zu-Tag-Varianz. Folglich sollte für eine Versuchsserie die gleiche Charge einer Färbelösung verwendet werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

5. Präzision der 2-dimensionalen Gelelektrophorese (2-DE): Quantifizierung von Proteinen mit scheinbaren Ladungsunterschieden

5.1 Isoelektrischer Punkt (pI): Definition und Berechnung

Der isoelektrische Punkt (pI) ist neben der Molekularmasse eine weitere charakteristische Größe des Proteins. Bei diesem pH-Wert hat das Protein ihre schlechteste Löslichkeit. Er beschreibt den pH-Wert eines Proteins, bei dem die Gesamtladung null beträgt, d. h. die positiven und negativen Ladungen sich ausgleichen. Näherungsweise lässt er sich nach Gleichung 60 aus der Primärsequenz berechnen [159].

$$Z = \text{N-Term} + \text{C-Term} + \alpha \cdot K + \beta \cdot R + \gamma \cdot H + \delta \cdot D + \varepsilon \cdot E + \zeta \cdot C + \eta \cdot Y \quad \text{(Gleichung 60)}$$

Z Gesamtladung des Proteins

$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon, \zeta, \eta$ Anzahl geladener Aminosäuren im Protein

Für die positiven Ladungen (N-Terminus (N-Term), Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H)) gilt die Gleichung 61, während für die negativen Ladungen (C-Terminus (C-Term), Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Cystein (C) und Tyrosin (Y)) Gleichung 62 gilt:

$$\text{Partialladung (positiv)} = \frac{1}{10^{pH-pK_a} + 1} \quad \text{(Gleichung 61)}$$

$$\text{Partialladung (negativ)} = \frac{-1}{10^{pK_a-pH} + 1} \quad \text{(Gleichung 62)}$$

Eine mögliche Methode besteht darin, von pH = 0 aus schrittweise einen höheren pH-Wert in die Gleichung einzusetzen, bis die Gesamtladung $Z = 0$ beträgt [160]. Aufgrund der je nach Quelle (DTASelect, Solomon's, EMBOSS etc.) variierenden pKs-Werte werden unterschiedliche pI-Werte erhalten. Oftmals weichen die berechneten pI-Werte von den experimentell ermittelten Werten ab [159]. Bei diesen verein-

fachten Modellen werden post-translationalen Modifikationen (PTMs) nicht berücksichtigt. Es wird auch der Einfluss benachbarter Seitenketten auf die pKs-Werte außer Acht gelassen, ebenso wie der Auf- und Abbau von Disulfidbrücken.

5.2 Ursachen für Ladungsheterogenitäten bei Proteinen

Viele Proteine erscheinen auf 2-D Gelen in Form von Spotgruppen (Abbildung 5-1), oft unterscheiden sie sich in ihren Ladungen, aber nicht in ihren Molekularmassen. Dies lässt sich auf unterschiedliche Gründe zurückzuführen. Drei Theorien werden im Folgenden vorgestellt.

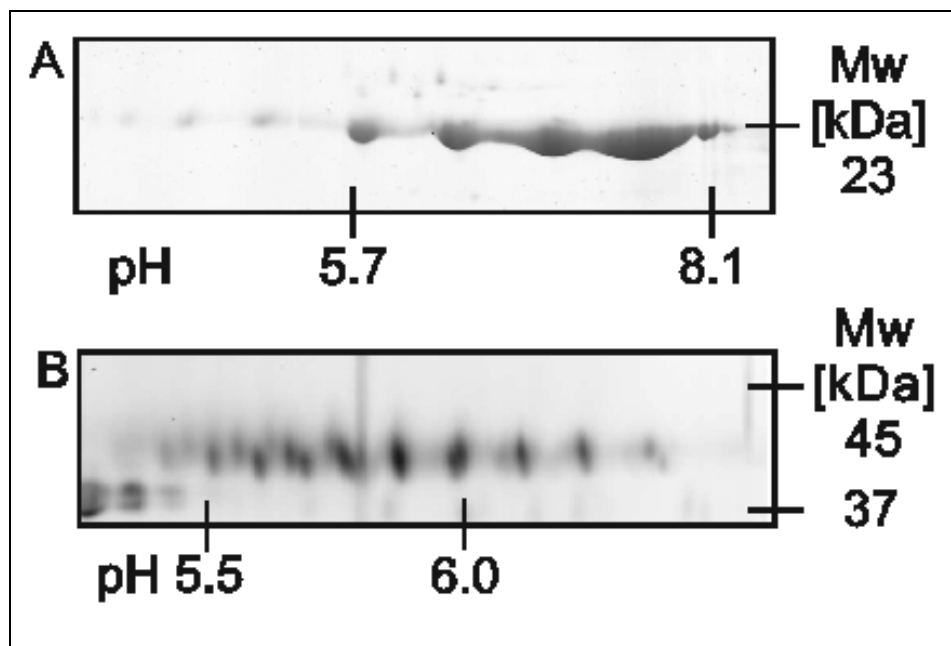


Abbildung 5-1:

(A) Ladungsheterogenität des Trastuzumabs, 2-DE mit Coomassie-Färbung [44]

(B) Proteinmuster von Arachin 6 in einem Erdnuss-Extrakt, 2-D-DIGE [161].

5.2.1 Post-translationale Modifikation (PTM)

Die Post-translationale Modifikation (PTM) wird sehr häufig als Grund für die Ladungsheterogenität genannt [27, 162]. Sie beschreibt die enzymatische kovalente Modifikation der Aminosäuren in-vivo nach der Translation, daraus resultieren Änderungen der Konformation, Funktion und Aktivität des Proteins [163]. Die unterschiedlich modifizierten Vertreter desselben Proteins werden als Isoformen bezeichnet. Einige davon dienen in der Proteomforschung als potentielle Indikatoren für Krankheiten [54, 55, 164]. Der Nachweis der PTMs erfolgt mit der Massenspektrometrie (MS) [165, 166], durch spezifische Färbemethoden [107] oder durch enzymatische Spaltungsreaktionen [162].

Die am häufigsten in Eukaryoten vorkommende PTM, nämlich die Glykosylierung [167, 168], verursacht Modifikationen, die einen niedrigeren pI und eine höhere Molekularmasse aufweisen [169, 170]. In einem Versuch mittels der 2-DE wurde anschaulich dargestellt, wie die Unterschiede in Masse und in der Ladung nach einer Deglykosylierung und Entfernung von Sialinsäureresten verschwanden [43].

Es gibt aber auch Modifikationen, die die Molekularmasse nur geringfügig verändern und zu den sogenannten „Ladungssträngen“ führen können, wie z. B. die Phosphorylierung [162], Entschwefelung [171], Deamidierung [163], Acylierung und Alkylierung [27]. Allerdings konnten in manchen Fällen keine PTMs für „Ladungsstränge“ nachgewiesen werden [172]. Daher sollte eine beobachtete Ladungsheterogenität auf 2-D Gelen nicht gleich als PTM gedeutet werden [172].

Eine auch sehr häufig vorkommende Modifikation ist die Oxidation. Dabei werden z. B. Cysteingruppen oxidiert (Beispiel: Fruktose-1,6-bisphosphatase). Der Verlust von Gruppen mit sauren Eigenschaften führt zur Bildung von basischen Modifikationen [172].

5.2.2 Artefakt-Bildung

Die zweite Theorie beschreibt die scheinbaren Ladungsunterschiede als Artefakte, die durch Oxidationsreaktionen [29] oder auch Reduktionsreaktionen verursacht werden und durch Salze während der IEF ausgelöst werden [173]. Eine Reduktion von Carboxylsäuregruppen zu Aldehyden und Alkoholen erhöht den isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins.

Noch häufiger wird die Bildung von Ladungssträngen der Carbamylierung durch Harnstoff zugeschrieben. Harnstoff ist Bestandteil der Rehydratationslösung und wird beizichtigt unter Wärme und bei Lagerung Isocyanate zu bilden [28, 174, 175]. Die Isocyanate würden die basischen Gruppen des Proteins wie Lysin oder Arginin angreifen und zu sauren Modifikationen führen.

Dagegen spricht aber, dass während der IEF die auftretenden Ionen direkt zu der jeweiligen Elektrode, im Fall des Isocyanates also zu der Anode, transportiert werden. Damit wäre dieses Anion dem elektrischen Feld entzogen worden und kann nicht mehr mit den Proteinen reagieren [176]. Es wurde auch gezeigt, dass die Lagerung über 48 Stunden und bei 50 °C die besagte Carbamylierung hervorrufen kann [175]. Eigene Versuche haben gezeigt, dass die Durchführung der IEF bei einer höheren als der von Görg vorgeschlagenen Standardtemperatur von 20 °C zwar die Auflösung der Spots verschlechtert, eine Verstärkung der Ladungsheterogenität konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 5-2).

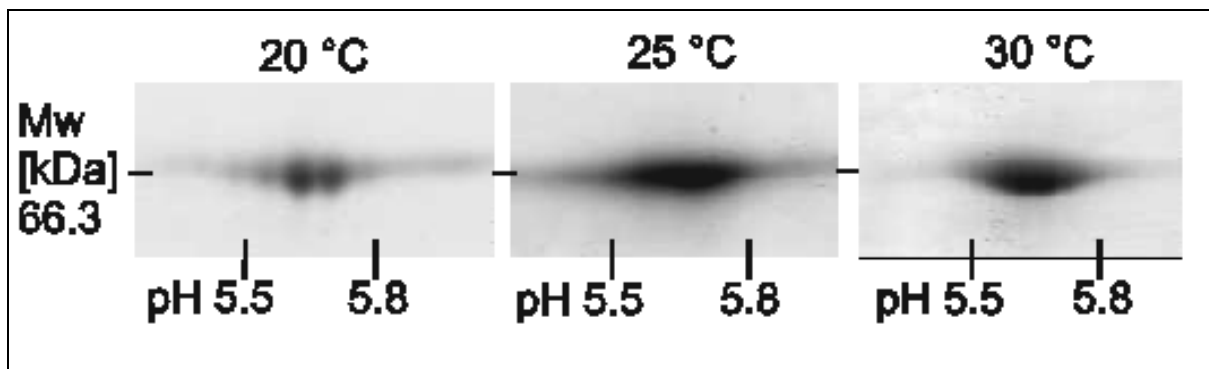


Abbildung 5-2:

BSA-Auftrennung in Abhängigkeit von der Temperatur während der IEF. Die Auflösung verschlechtert sich mit der Temperaturerhöhung.

5.2.3 Konformer- und Komplexbildung

Oft kann mittels MS kein Unterschied zwischen den einzelnen Spots einer Serie, die Ladungsheterogenität aufweist, festgestellt werden. Eine vielversprechende Methode, die hinzugezogen werden kann, ist die Re-Elektrophorese [30, 31, 177, 178]. Spots von 2-D Gelen werden innerhalb ihrer Grenzen ausgeschnitten und einer weiteren 2-DE unterworfen. Mit dieser Methode wurde demonstriert, dass Spots mit scheinbarer Ladungsheterogenität ineinander überführt werden können. Aus einem einzelnen Spot des ursprünglichen Ladungsstranges können wieder neue Ladungsstränge erzeugt werden. Wider Erwartungen können aus einem Spot vom sauren Ende des Ladungsstranges sogar Spots mit höchsten pIs gebildet werden [30].

Als mögliche Ursachen für dieses Phänomen wurden die konformere Änderung des Proteins [30, 179] oder Komplexreaktionen [178] genannt. Definitionsgemäß sind Konformere Strukturen gleicher Sequenz und gleicher Masse. Der Unterschied liegt in der Exposition ihrer Seitenketten. Werden basische Seitenketten im Inneren des Proteins versteckt, stellt sich ein niedrigerer pI ein.

Versetzt man Proteine mit Mangan-Ionen in-vitro, bilden sich mit der Zeit ebenfalls Spot-Reihen ähnlicher Masse [178]. Auch in-vivo Reaktionen, wie z. B. mit Eisen, wurden als mögliche Ursachen in Betracht gezogen [180].

5.3 Re-Elektrophorese als Beweis für die Konformeren-Theorie

Analysiert man BSA mit der 2-DE, können Spotgruppen mit bis zu sieben unterschiedlichen pIs beobachtet werden (Abbildung 5-3). In früheren Arbeiten mit der Kapillarzonenoelektrophorese (CZE) wurden dagegen nur drei Signale gefunden [170]. Diese Abweichung zeigt, dass multiple Spots nicht unmittelbar das Vorhandensein multipler Isoformen bedeutet.

Nach der 2-DE wurden die drei Proteinspots mit den höchsten Intensitäten innerhalb ihrer Grenzen aus den Gelen ausgeschnitten und nach Aufbereitung ein zweites Mal mit der 2-DE analysiert. Jeder Spot trennte sich in 3 Spots auf (Abbildung 5-3). Der Spot in der Mitte der neuen Proteingruppe wies wiederum die höchste Intensität auf.

Diese Beobachtung entspricht auch anderen Re-Elektrophoreseversuchen von „Isoform-Konformeren“. Proteine sind große Moleküle mit vielen Seitenketten, Proteinkonformere sind demnach Proteine mit gleichen Sequenzen, die sich nur in ihrer Konformation unterscheiden. Zeigen nämlich basische Seitenketten ins Innere der Proteine, so würde der isoelektrische Punkt saurer werden. Im anderen Fall, wenn saure Gruppen des Proteins ins Innere rücken, dann würde man eine Erhöhung des pIs beobachten [30].

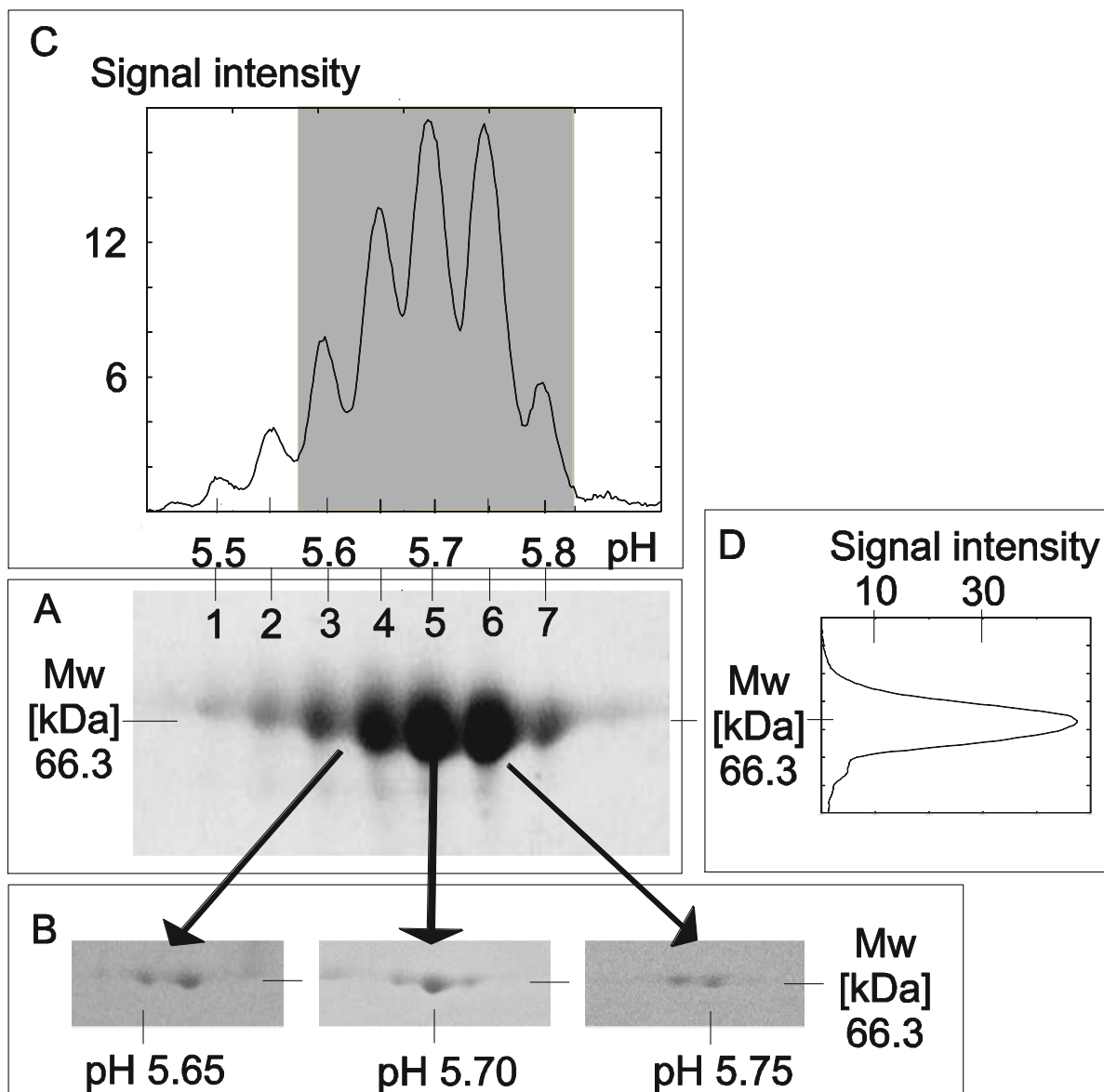


Abbildung 5-3:

Re-Elektrophorese von BSA;

(A) Die 3 Spots mit den höchsten Intensitäten wurden innerhalb ihrer Grenzen ausgeschnitten, aus den Gelen gelöst und erneut mit 2-DE getrennt;

(B) Jeder Spot trennte sich in drei neue Spots auf;

(C) Die Pixelintensität wurde entlang der Molekularmassen-Achse aufsummiert; die grau schattierten Peaks wurden quantifiziert.

(D) Die Signalintensität wurde entlang der pI-Achse aufsummiert; damit wurden alle Spots des Proteins berücksichtigt.

5.4 Methodenvalidierung

5.4.1 Linearität

Die Linearitätsuntersuchung für BSA, die leichte Kette des Matuzumabs, β -Laktoglobulin, Myoglobin und Ovalbumin wurde mit 5 bis 7 unterschiedlichen für jedes Protein variierenden Konzentrationen von 0,007 – 0,175 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Für diese Proteine war das Bestimmtheitsmaß R^2 größer gleich 0,97 (Abbildung 9-2 – Abbildung 9-6). Das Bestimmtheitsmaß R^2 für die schwere Kette des Matuzumabs war 0,90 (Abbildung 9-3).

5.4.2 Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N)

Die für die Prüfung auf Linearität analysierten Elektropherogramme wiesen S/N von 26 – 356 auf. Die für die Reproduzierbarkeit ausgewerteten Elektropherogramme zeigten ein S/N von 165 – 320 für die Quantifizierung des Gesamtproteins bzw. 45 – 348 für die Quantifizierung der Einzelspots.

5.4.3 Reproduzierbarkeit

Nachdem frühere Versuche mit 1-DE gezeigt haben, dass die Charge von Färbelösungen einen entscheidenden Einfluss auf die Präzision hat, wurden CCB-Färbelösung in großen Chargen von 5000 ml hergestellt. Während der gesamten IEF wurde der Verlauf der Spannung und des Stromes dokumentiert (Abbildung 5-5) [181]. Viele Proteine formen auf 2-D Gelen Ladungsstränge [44, 161]. Manche besitzen eine Perlenketten-artige Struktur [26], die Spots sind horizontal durch eine Schmierspür miteinander verbunden. Diese Hintergrundvariation erschwert die Quantifizierbarkeit der einzelnen Spots erheblich (Abbildung 5-4).

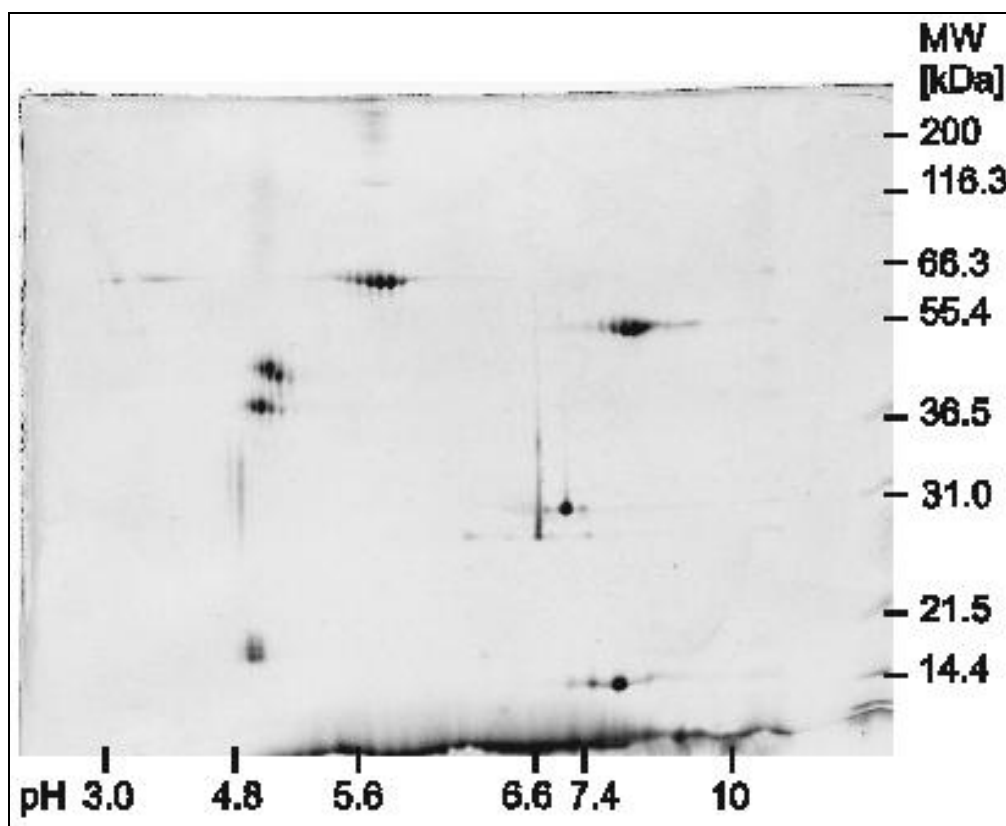


Abbildung 5-4: Repräsentatives Gel für die 2-DE.

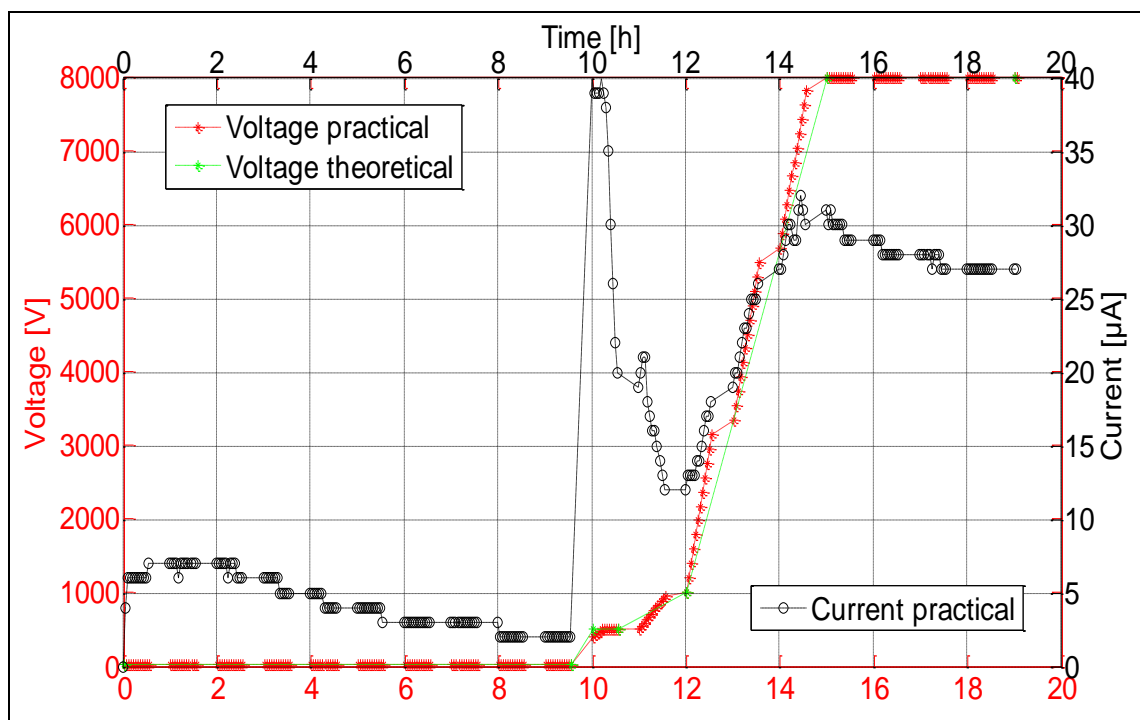


Abbildung 5-5: Repräsentativer Spannungs- und Stromverlauf bei der IEF.

Es wurden für die Präzisionsuntersuchung Modell-Proteine ausgesucht, die mehrere Spots auf den 2-D Gelen verursachen. Um die Scan-zu-Scan-Variabilität zu minimieren, wurde Carboanhydrase Isoform I als interner Standard eingesetzt. Zur Quantifizierung dienten 3 verschiedene Methoden: I) Spot für Spot, II) die Summe der Spots und III) Quantifizierung des Proteins als Ganzes (Abbildung 5-3). Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Methoden auf die Präzision untersucht.

Für die Methoden I) und II) wurden mittels MATLAB und CISS die Pixelintensitäten entlang der Molekularmassen-Achse aufaddiert (Abbildung 5-3 C). Für die Quantifizierung nach Methode III) erfolgte die Addition der Pixelintensitäten entlang der pI-Achse (Abbildung 5-3 D). Die Integration der Signalintensitäten erfolgte mit Delta2D und CISS für Methode I) und II). Methode III) wurde nur mit CISS durchgeführt. Um die Gel-zu-Gel-Variation zu eliminieren und Varianzhomogenität gegeben war, wurde die gepoolte RSD% berechnet (Gleichung 56 und Tabelle 9-5).

Abschließend wurden die einzelnen Methoden (Methode II mit CISS und Delta2D) durch F-Tests beurteilt. Die Ausführung der Methode II) mit Delta2D war in 2 Fällen der Methode II) ausgeführt mit CISS überlegen (Tabelle 9-6). Wenn man allerdings die Methode III), die nur die CISS-Software ermöglicht, verwendet, und die Präzisionsdaten mit den Daten aus Methode II) und Delta2D erhaltenen Daten vergleicht, so ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (Tabelle 9-7).

Für bekannte Proteine ist die Methode III) die beste Wahl. Wenn aber die einzelnen Spots wirkliche PTMs darstellen, so ist daher die Zu- und Abnahme jedes einzelnen Spots von Interesse [182–185]. In dem Fall sollte die Quantifizierung nach Methode I), nämlich die Quantifizierung der einzelnen Spots, und nach Methode III) die Quantifizierung des gesamten Proteins erfolgen.

5.4.3.1 BSA

Wie bereits erwähnt sind für BSA auf 2-D Gelen sieben Spots zu sehen (Abbildung 5-3 A). Für die Methoden I) und II) wurden nach der ICH-Guideline Q2R [11] nur die Spots berücksichtigt, deren S/N größer gleich 10 ist. Durch Methode III)

konnten auch die weniger intensiven Spots quantifiziert werden. Die erhaltenen $RSD\%_{\text{pooled}}$ betrugen 11,3 – 15,1 % für Methode I), 11,3 % für Methode II) und 8,6 % für Methode III) (Tabelle 9-5).

5.4.3.2 Myoglobin

Der Gelbereich, der die Myoglobin-Spots enthielt, unterlag starker Hintergrundfärbung (Abbildung 5-6). Daraus resultierte ein niedriges S/N. Als mögliche Ursache für die Hintergrundfärbung kommen Trägerampholyte und andere Substanzen in Frage, die in den niedermolekularen Bereichen des SDS-PAGE in den Gelporen stecken bleiben und Coomassie-Moleküle binden. Daher waren die $RSD\%_{\text{pooled}}$ beim Myoglobin insgesamt höher als bei den anderen untersuchten Proteinen. Eine gepoolte $RSD\%$ von 16,8 – 21,8 % wurde erhalten (Tabelle 9-5).

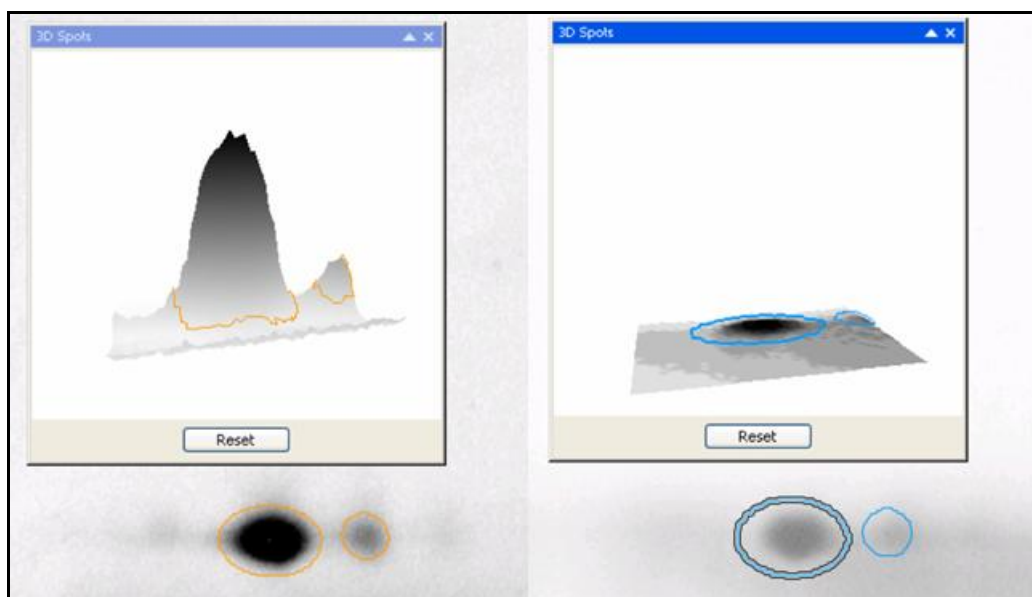


Abbildung 5-6: Gelbild und Elektropherogramm des Proteins Myoglobin; auf beide Gele (orange und blau) wurde die gleiche Menge Myoglobin aufgetragen. Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung sind die Spots des blau gekennzeichneten Geles kaum zu sehen.

5.4.3.3 Matuzumab

Das Matuzumab konnte nicht berücksichtigt werden. Die schwere Kette mit pIs in einem basischen Bereich nahm inkonsistente Spotformen an, eine unterschiedliche Anzahl von isoelektrischen Punkten wurde beobachtet. Mögliche Gründe sind die Empfindlichkeit des basischen pH-Gradienten gegenüber Elektroosmose und partielle Hydrolyse.

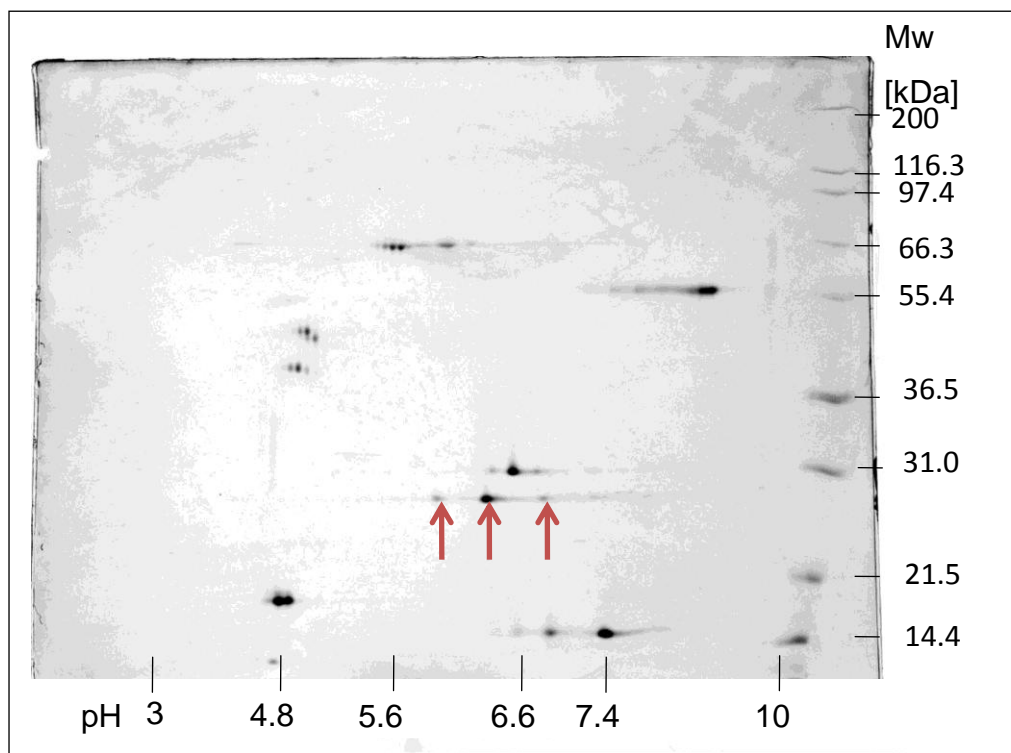


Abbildung 5-7: Bei 200 kVh lässt sich Matuzumab in 3 Spots auftrennen (rote Pfeile).

Die leichte Kette des Matuzumabs konnte ebenfalls nicht quantifiziert werden, weil sie aus ungeklärten Gründen unter den eingesetzten Versuchsbedingungen einen vertikalen Streifen auf dem Gel verursachte. Aus ebenfalls ungeklärten Gründen ließ sich dieses Protein dagegen bei längerer Fokussierungszeit (200 kVh) auftrennen (Abbildung 5-7).

5.4.3.4 Ovalbumin

Für Ovalbumin erhielt man 2 verschiedene Gruppierungen auf dem 2-D Gel. Da keine Trennung der einzelnen Spots innerhalb der Gruppen möglich war, wurden die einzelnen Gruppen zusammen integriert. Mit der Methode III) wurde eine $RSD\%_{\text{pooled}}$ von 10 % erzielt (Tabelle 9-5).

5.4.3.5 β -Laktoglobulin

Das β -Laktoglobulin, das bekannt ist für seine pH-abhängige Agglomeration, zeigte sich auf den 2-D Gelen als Dimer mit 2 isoelektrischen Punkten [186, 187]. Mit CISS konnte keine Basislinientrennung für die 4 Spots erhalten werden. Daher wurde die ganze Spotgruppen zusammen als Ganzes mit der Methode III) integriert. Als Ergebnis wurde eine $RSD\%_{\text{pooled}}$ von 12 % erhalten (Tabelle 9-5).

5.4.4 Detektionsgrenze / Bestimmungsgrenze

Nach dem Europäischen Arzneibuch [45] ist eine qualitative Bestimmung ab einem S/N von 3 durchführbar. Für eine Quantifizierung muss ein S/N größer gleich 10 gegeben sein, wenn $RSD\%$ von 10 % akzeptabel ist. Für höhere Präzision ist ein höheres S/N nötig. Die zur Prüfung auf Linearität erhaltenen Signale wiesen durchweg S/N größer als 26 auf. Damit wurden die Detektions- und die Bestimmungsgrenze überschritten.

5.5 Zusammenfassung

Mit der 2-DE lassen sich Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Molekularmasse trennen. Manche Proteine erscheinen auf den 2-D Gelen als multiple Spots in einem horizontalen perlenkettenartigen Strang, die schwer voneinander zu trennen sind. Diese werden oft als Isoformen gedeutet. Wenn aber z. B. durch MS kein Unterschied zwischen den einzelnen Spots festgestellt werden kann, lässt die Tatsache auf Artefakte oder Konformere schließen. Die Existenz von Konformeren und Komplexen lässt sich mittels der Re-Elektrophorese nachweisen, wenn sich die einzelnen Spots sich ineinander überführen lassen. In dieser Studie wurde eine SOP erstellt, die die präzise Quantifizierung von Proteinen mit scheinbaren Ladungsunterschieden sicherstellen soll (Abbildung 5-8).

Wenn also die Vermutung besteht, dass die Proteine mit den scheinbaren Ladungsunterschieden Konformere sind, dann sollten zur Quantifizierung alle Spots zusammen integriert werden. Handelt es sich aber wirklich um echte Isoformen, so ist eine Spot-weise Integration sinnvoll. Für die Qualitätskontrolle bekannter Proteine ist die Quantifizierung ganzer Stränge bzw. die Summe aller Spots zu empfehlen (Tabelle 9-7).

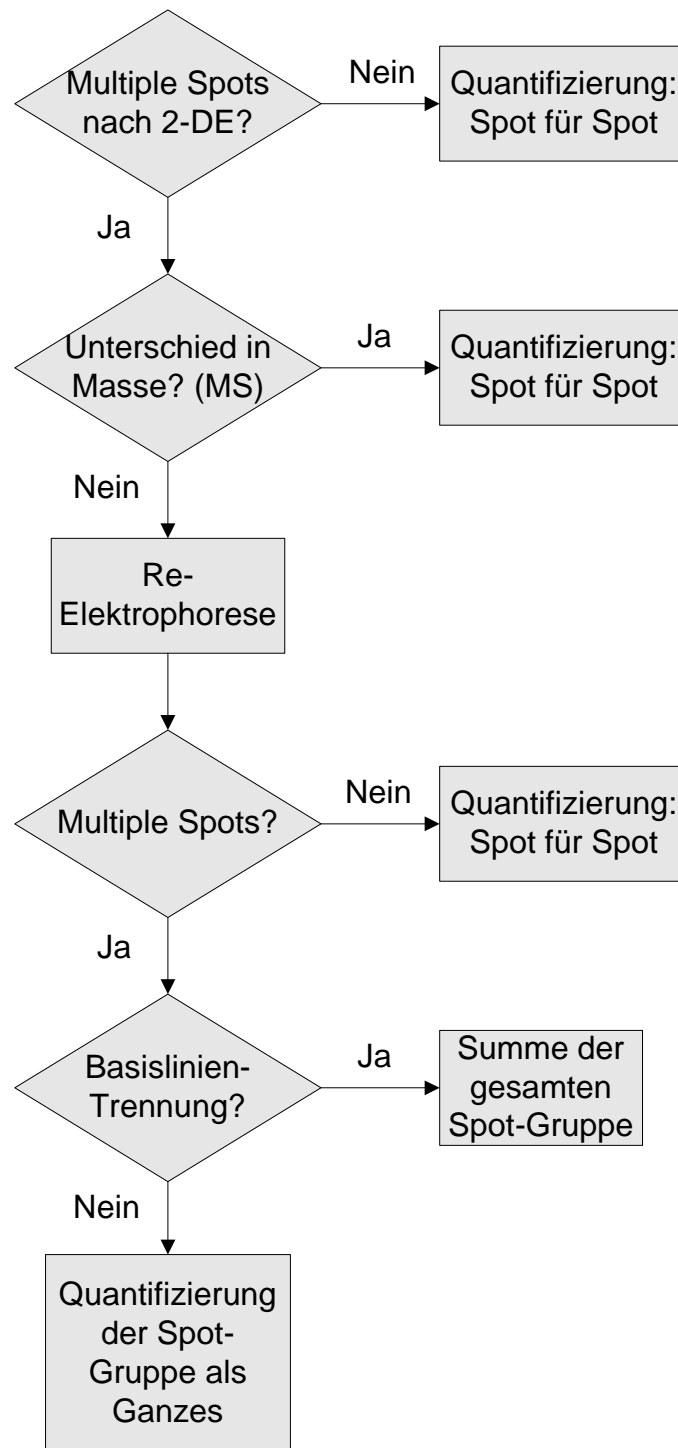


Abbildung 5-8: SOP für die präzise Quantifizierung von Proteinen mit scheinbaren Ladungsunterschieden.

6. Detektion von multiplen Ausreißern

6.1 Definitionen

6.1.1 Extremwerte - Ausreißer

Ausreißer sind extreme Werte, die von den restlichen Werten einer Messreihe abweichen [122]. Die Ursachen für das Auftreten der Extremwerte muss gesondert untersucht werden [188]. Ausreißer, die in der Qualitätskontrolle der pharmazeutischen Industrie auftreten, bedürfen z. B. einer OOS-Untersuchung (OOS, Engl.: out of specification). Erst wenn nachgewiesen ist, dass der Auslöser dem kontrollierenden Labor, wie z. B. falsches Ablesen und Kalibrierung der Messgeräte, und nicht dem Produkt zuzuschreiben ist, darf der OOS-Wert nach einem Ausreißertest entfernt werden [189].

Mögliche Ursachen neben der Existenz eines echten Ausreißers ist ebenfalls eine falsche Annahme über das Verteilungsmuster der Daten oder eine falsche Probenahme [188]. Des Weiteren können Datenwerte zufällig streuen.

Häufig lassen sich Ausreißer schwer visuell detektieren und diese Methode ist sehr subjektiv [190]. Daher bedient man sich statistischen Tests, um Ausreißer zu erkennen. Vor allem der Mittelwert sowie die Standardabweichung können durch Extremwerte stark beeinflusst werden.

Die Nullhypothese H_0 bei den Ausreißertests lautet: x_n ist ein Ausreißer. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, wird vor der Durchführung von parametrischen Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit α festgelegt, die gewöhnlich 0,05 oder 0,01 beträgt. Führt ein Wert unter der Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05 zur Verwerfung der Nullhypothese H_0 , jedoch nicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01, ist dieser Wert ein „wahrscheinlicher Ausreißer“ und bedarf näherer Untersuchung [118]. Wird die Nullhypothese mit $\alpha = 0,01$ verworfen, dann liegt ein „signifikanter Ausreißer“ vor.

6.1.2 „Masking“ und „Swamping“

Besonders schwierig ist die Detektion von mehreren Ausreißern in einer Messreihe. Für die Detektion von multiplen Ausreißern in univariaten Datensätzen stehen zwei Prozesse zur Verfügung, die Block-Prozedur oder die konsekutive Prozedur. Bei der Block-Prozedur wird die maximale Anzahl der Ausreißer k geschätzt und der Ausreißertest k -mal, jeweils unter Auslassen des extremsten Wertes, d. h. des größten oder kleinsten Wertes, durchgeführt. Ist allerdings die geschätzte Anzahl größer als die tatsächlich enthaltene Anzahl der Ausreißer, können auch „Nicht-Ausreißer“ als „Ausreißer“ deklariert werden. Es droht der „Swamping“-Effekt [121] (Abbildung 6-1).

Wird ein Ausreißer aufgrund des Vorliegens eines zweiten Ausreißers durch einen statistischen Test nicht erkannt, spricht man von Maskierung (Abbildung 6-1). Dies ist häufig der Fall bei konsekutiver Anwendung von Ausreißertests, d. h. nur bei Erkennung eines Ausreißers wird dieser Wert aus der Messreihe entfernt und der nächstkleinere bzw. -größere Wert wird getestet. Sind z. B. die zwei extremsten Werte ähnlich groß, werden sie häufig nicht als Ausreißer erkannt. Viele konventionelle Ausreißertests sind nicht in der Lage mehrere Ausreißer zu erkennen. Bei Verdacht auf „Masking“ und „Swamping“-Effekte sollten die Daten auf jeden Fall graphisch analysiert werden [191].

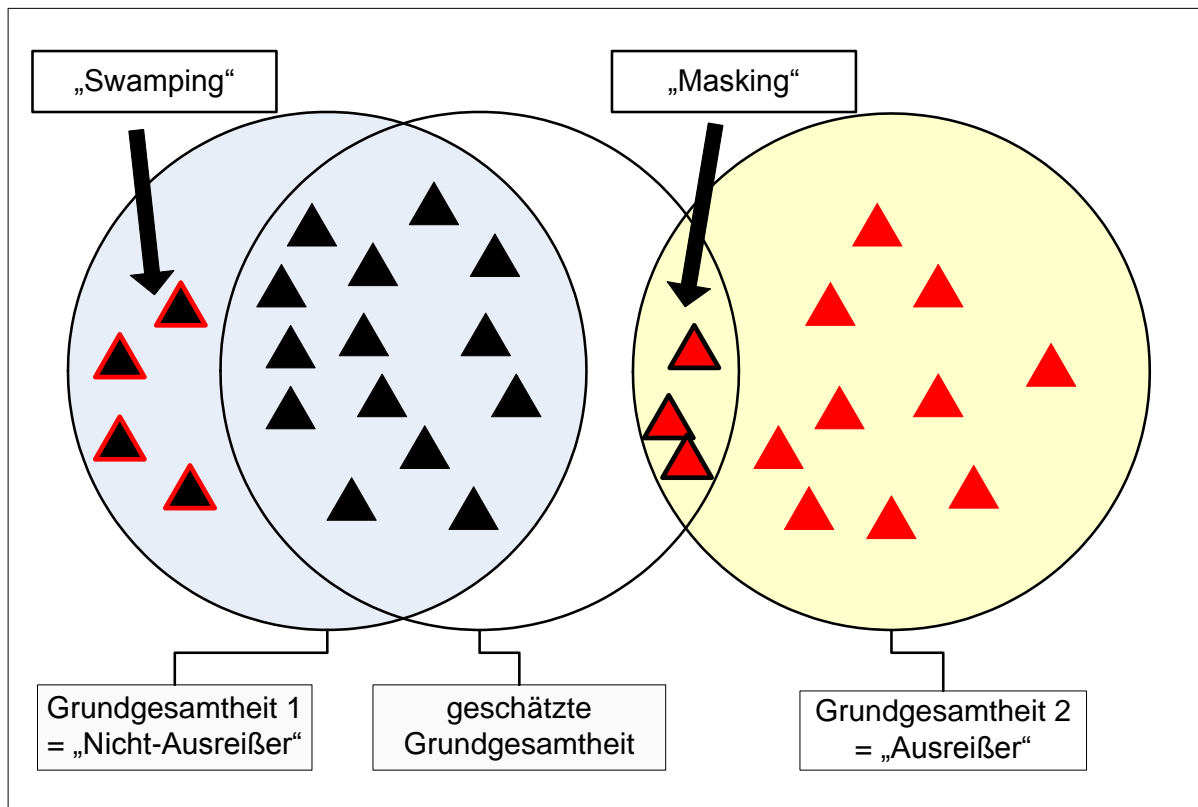


Abbildung 6-1:

„Masking“: „Ausreißer“ werden nicht erkannt;

„Swamping“: „Nicht-Ausreißer“ werden als „Ausreißer“ deklariert.

6.1.3 Test-Schärfe und Sicherheit

Bei statistischen Tests stellen die Test-Schärfe und die Test-Sicherheit Gegenspieler dar (Kapitel 2.2.2.4). Je kleiner die Irrtumswahrscheinlichkeit α gesetzt ist, desto kleiner ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird, d. h. die Nullhypothese kann mit einer höheren Sicherheit abgelehnt werden. Aber parallel dazu führt eine hohe Sicherheit mit kleinem α -Fehler zu einem höheren β -Fehler. Damit verschlechtert sich die Testschärfe und vorhandene Ausreißer werden nicht erkannt.

Theoretisch sind beide Parameter wichtig. Praktisch muss man aber entscheiden, welcher Fehler, nämlich z. B. einen Ausreißer nicht zu erkennen (Priorität: hohe Si-

cherheit) oder einen falschen Alarm auszulösen (Priorität: hohe Testschärfe), der schwerwiegendere ist.

6.2 Konventionelle Ausreißertests

6.2.1 Grubbs-Test

Mit dem Grubbs-Test werden jeweils der größte und der kleinste Wert einer Messreihe daraufhin untersucht, ob sie zur gleichen Grundgesamtheit wie die restlichen Werte der Stichprobe gehören [122]. Mit Gleichung 63 werden die Prüfwerte berechnet. Diese werden mit tabellierten Schwellenwerten verglichen. Sind die Prüfwerte größer als die Schwellenwerte, liegen Ausreißer vor. Der Grubbs-Test wird vor allem für eine Stichprobenanzahl $n > 30$ eingesetzt.

Um mehr als 2 Ausreißer zu detektieren, wird eine Abwandlung des Tests durchgeführt, der generalisierter ESD-Test genannt wird. Dieser gleicht der Durchführung des Grubbs-Testes im Blockverfahren (siehe Kapitel 6.1.2) [190]. Es werden jeweils der kleinste und der größte Wert der Stichprobe getestet [191]. Die Prüfgrößen T_1 und T_n werden mit den tabellierten Schwellenwerten verglichen.

6.2.2 Nalimov-Test

Der Nalimov-Test ist eine weitere Abwandlung des Grubbs-Testes. Hier spielt zusätzlich die betrachtete Anzahl der Werte n eine Rolle. Für die Ausführung wird die Stichprobe zunächst der Größe nach sortiert. Die Schwellenwerte r sind tabelliert. Für den Freiheitsgrad df gilt $df = n - 2$. x_n ist der größte oder der kleinste Wert der Stichprobe. Ist r_n (Gleichung 64) größer als der tabellierte Wert $r_{Tab,n-2,\alpha}$, wird der Test nach dem Auslassen des auffälligen Wertes, der Neuberechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung [192] erneut durchgeführt.

6.2.3 Dixon-Test

Der Dixon-Test eignet sich vor allem für kleine Stichproben mit $n < 25$ [122]. Auch hier werden jeweils der kleinste und der größte Wert der Stichprobe untersucht. Da dieser Test nur auf kleine Stichprobengrößen mit maximal zwei Ausreißern [193] ausgelegt ist, darf dieser Test nicht beliebig oft wiederholt werden [32, 194].

Es gibt unterschiedliche Varianten des Dixon-Testes, abhängig von der Stichprobenanzahl und der Lage der Ausreißer, ob sie an einem oder an beiden Enden einer Stichprobe zu vermuten sind [122, 190]. Ein Beispiel für einen Dixon-Test für 2 Ausreißer an einem Ende der Stichprobe wird in Tabelle 6-1, Gleichung 65, aufgeführt. Um den kleinsten Wert zu testen, wird der zweitkleinste Wert ausgelassen, um eine mögliche Maskierung zu verhindern. Dementsprechend wird für die Untersuchung des größten Wertes der zweitgrößte Wert ausgelassen.

Tabelle 6-1: Verwendete Ausreißertests.

| Test | Formel | x_n oder x_1 ist ein Ausreißer, wenn |
|--|--|---|
| Konventionelle Ausreißertests, Voraussetzung: Normalverteilung | | |
| Nalimov [192] | $r_{n,\alpha} = \frac{ x_n - \bar{x} }{\hat{\sigma}} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}} \quad \textbf{(Gleichung 63)}$ | $r_{n,\alpha} > r_{\text{Tab},n-2,\alpha}$ verwerfe H_0 |
| ESD [190] | $T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{\hat{\sigma}}, \quad T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{\hat{\sigma}} \quad \textbf{(Gleichung 64)}$ | $T_1 > T_{\text{Tab},n,\alpha}$ oder $T_n > T_{\text{Tab},n,\alpha}$ verwerfe H_0 |
| Dixon Q Test [118, 122] | $r_{22}^1 = \frac{x_3 - x_1}{x_{n-2} - x_1}, \quad r_{22}^n = \frac{x_n - x_{n-2}}{x_n - x_3} \quad \textbf{(Gleichung 65)}$ | $r_{22}^1 > r_{\text{Tab},n,\alpha}$ oder $r_{22}^n > r_{\text{Tab},n,\alpha}$ verwerfe H_0 |

6.3 Robuste Statistik

Die robuste Statistik verwendet z. B. als Lageparameter den Median und als Streuparameter die mediane absolute Deviation (MAD) [195]. Diese Parameter sind im Vergleich zum Mittelwert und der Standardabweichung gegenüber Ausreißerwerten weniger anfällig. Der Datensatz muss erheblich mit Ausreißern kontaminiert sein, um Auswirkungen auf den Median zu zeigen [33].

6.3.1 Boxplot

Der Boxplot, oder auch Box-Whisker-Plot genannt, wird eingesetzt, um visuell Datensätze miteinander zu vergleichen. Es gibt diverse Modifikationen. Sehr verbreitet ist der Boxplot mit den Parametern Median, Interquartilsabstand und Spannweite [190] (Abbildung 6-2).

Zunächst wird die Zahlenreihe der Größe nach sortiert und der mediane Wert bestimmt [118]. Der Median teilt den Datensatz in zwei Teile, die jeweils 50 % des Gesamtdatensatzes enthalten. Danach werden von diesen Untergruppen die Mediane bestimmt und man erhält das 1. Quartil bzw. das 3. Quartil. Vom 1. zum 3. Quartil wird eine Box gezeichnet, die 50 % aller Werte enthält, darunter auch den Median. Der Abstand vom 1. zum 3. Quartil wird Interquartilsabstand (IQR) genannt und stellt ein Maß für die Streuung dar (Gleichung 68) [118].

Zur Detektion von Ausreißern wird ein „innerer Zaun“ (Engl.: inner fence) im Abstand von 1,5-fachen des IQRs von der Box entfernt und ein „äußerer Zaun“ (Engl.: outer fence) im Abstand vom 3-fachen des IQRs eingezeichnet. Die Werte innerhalb des inneren Zaunes werden mittels einer horizontalen Linie, auch Schnurhaar (Engl.: whisker) genannt, mit der Box verbunden. Werte, die zwischen dem inneren und äußeren Zaun liegen, sind als „mögliche Ausreißer“ zu kennzeichnen. Werte, die den äußeren Zaun überschreiten, werden als „Ausreißer“ definiert.

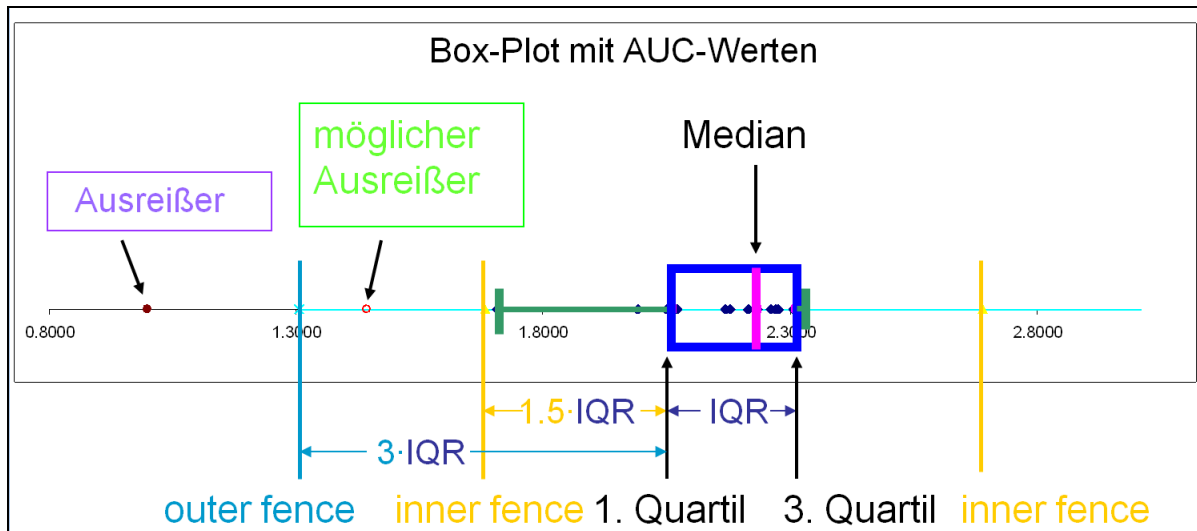


Abbildung 6-2: Boxplot zur Detektion von Ausreißern.

6.3.2 Median Absolute Deviation (MAD)

Die Median Absolute Deviation (MAD) ist der Median der absoluten Abweichungen vom Median und wird nach Gleichung 66 berechnet [32].

$$MAD = \text{med}(|x_{(1)} - \text{med}(x_1 \dots x_n)|, \dots, |x_n - \text{med}(x_1 \dots x_n)|) \quad (\text{Gleichung 66})$$

Mit MAD lässt sich auch die Standardabweichung σ schätzen (Gleichung 67) [33, 190].

$$\hat{\sigma} = \frac{MAD}{0,6745} = 1,483 \cdot MAD \quad (\text{Gleichung 67})$$

Es gibt mehrere Ausreißertests, die Gebrauch von MAD machen, wie die 3-MAD_E-Regel [196] oder die Hampel-Methode [35, 115] bzw. die modifizierte Z-Score-Methode [190, 196]. Für die 3-MAD_E-Regel gelten die Gleichungen 69 und 70. Dieselben Gleichungen gelten auch für die Hampel-Methode bzw. die modifizierte z-Score-Methode. Der Unterschied liegt im höheren Schwellenwert M_i , der bei 3,5 liegt. Die Überschreitung der Schwellenwerte durch die Prüfwerte führt zum Verwerfen von H_0 .

Tabelle 6-2:

Verwendete Tests aus der robusten Statistik zur Detektion von Ausreißern.

| Test | Formel | x_n oder x_1 ist ein Ausreißer, wenn |
|---------------------------------|---|--|
| Robuste Teststatistik | | |
| Box-Plot [118] | $Q_2 = \text{Median}, Q_1 = 1. \text{ Quartil}, Q_3 = 3. \text{ Quartil},$ $\text{IQR (Interquartilsbreite)} = Q_3 - Q_1$ (Gleichung 68) | $x_n < Q_1 - 1,5 \cdot \text{IQR}$ $x_n > Q_3 + 1,5 \cdot \text{IQR}$ verwerfe H_0 |
| 3-MAD _E -Regel [196] | $\text{MAD}_E = 1.483 \cdot \text{MAD}$ (Gleichung 69) $M_i = \frac{ x_i - \bar{x} }{\text{MAD}_E}$ (Gleichung 70) | $M_i > 3$ verwerfe H_0 |

6.4 Erzeugung der Datensätze

Für die 8 Fälle (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 8 Ausreißer) wurden jeweils 20 synthetische Datensätze mit je 20 Werten mit der Zufallszahlen-Funktion von MATLAB generiert. Die Population mit dem Mittelwert $\mu = 100$ und der Standardabweichung $s = 1$ stellen die „Nicht-Ausreißer“ dar, während die als „Ausreißer“ deklarierten Werte den Mittelwert $\mu = 104$ und die Standardabweichung $s = 1$ aufwiesen.

6.5 Guha's RNN Curve Algorithmus

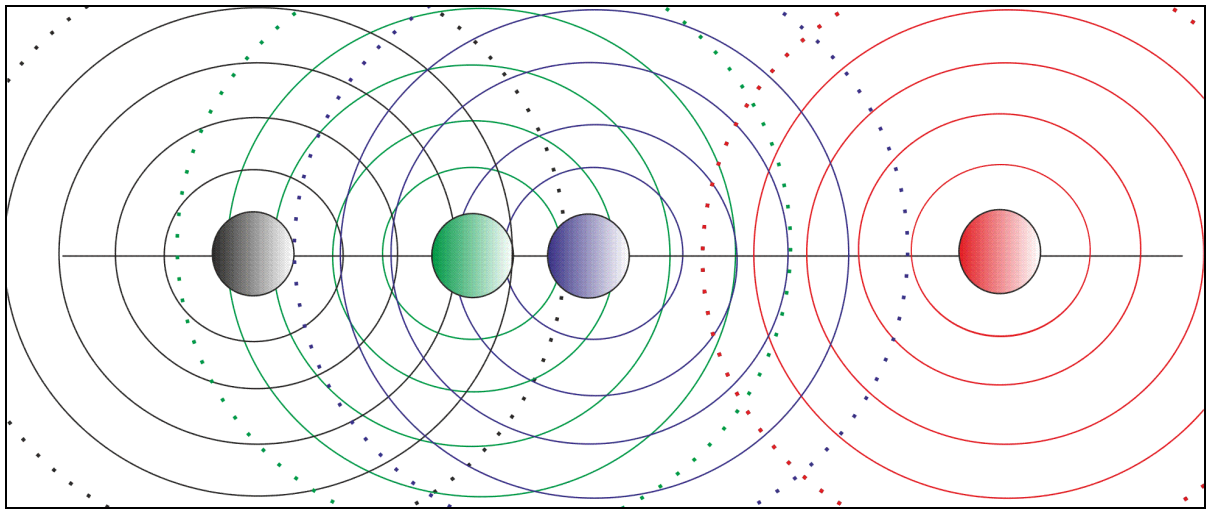


Abbildung 6-3: Um die jeweiligen Datenpunkte werden Kreise mit einem wachsenden Radius R angeordnet und die Anzahl der Nachbarn NN innerhalb des Radius gezählt.

Dieser Algorithmus wurde für die Chemometrik entwickelt, um Ausreißer innerhalb von Leitstruktur-Datenbanken zu erkennen. R-NN ist die Abkürzung für die Anzahl der Nachbarn (Engl.: Number of Neighbors) in Abhängigkeit vom Radius R . In dieser Arbeit wurde dieser Algorithmus für univariate Daten verwendet. Auf die Datenpunkte werden konzentrisch Kreise mit einem Radius R gelegt und die Anzahl der Datenpunkte, also der Nachbarn, innerhalb diesen Radius ermittelt. Nach und nach wird R in bestimmter Schrittweite ΔR erweitert, bis alle anderen Datenpunkte, die sogenannten „Nachbarn“, innerhalb R liegen (Abbildung 6-3). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der distanzbasierten k-NN-Methode, die nur die k-nächsten Nachbarn berücksichtigt, ist die Berücksichtigung aller Datenpunkte. Für jeden einzelnen Wert einer Messreihe erhält man einen Graphen, der die Anzahl der Nachbarn in Abhängigkeit von R darstellt (Abbildung 6-4).

Zur Bewertung wird die maximale Steigung der Graphen herangezogen [37]. Ist der Wert ein Ausreißer, dann ist die maximale Steigung bei einem großen R , d. h. erst ab einem großen R wird eine große Anzahl von Nachbarn gefunden.

6.6 Auswertung der Tests

Guha's RNN Curves und die Auswertung über die maximale Steigung der Kurven lässt eine visuelle Bewertung der Daten zu [37]. Um aber klare Grenzen für die Ausreißeridentifizierung zu setzen, wurde die Fläche unter den R-NN Plots (AUC) berechnet. Die AUC-Kalkulation erfolgt mittels der Trapezmethode [197]. Je weiter abseits ein Datenpunkt liegt, desto kleiner ist die AUC. Zuletzt werden die AUC-Werte einer Stichprobe durch den kleinsten AUC-Wert geteilt.

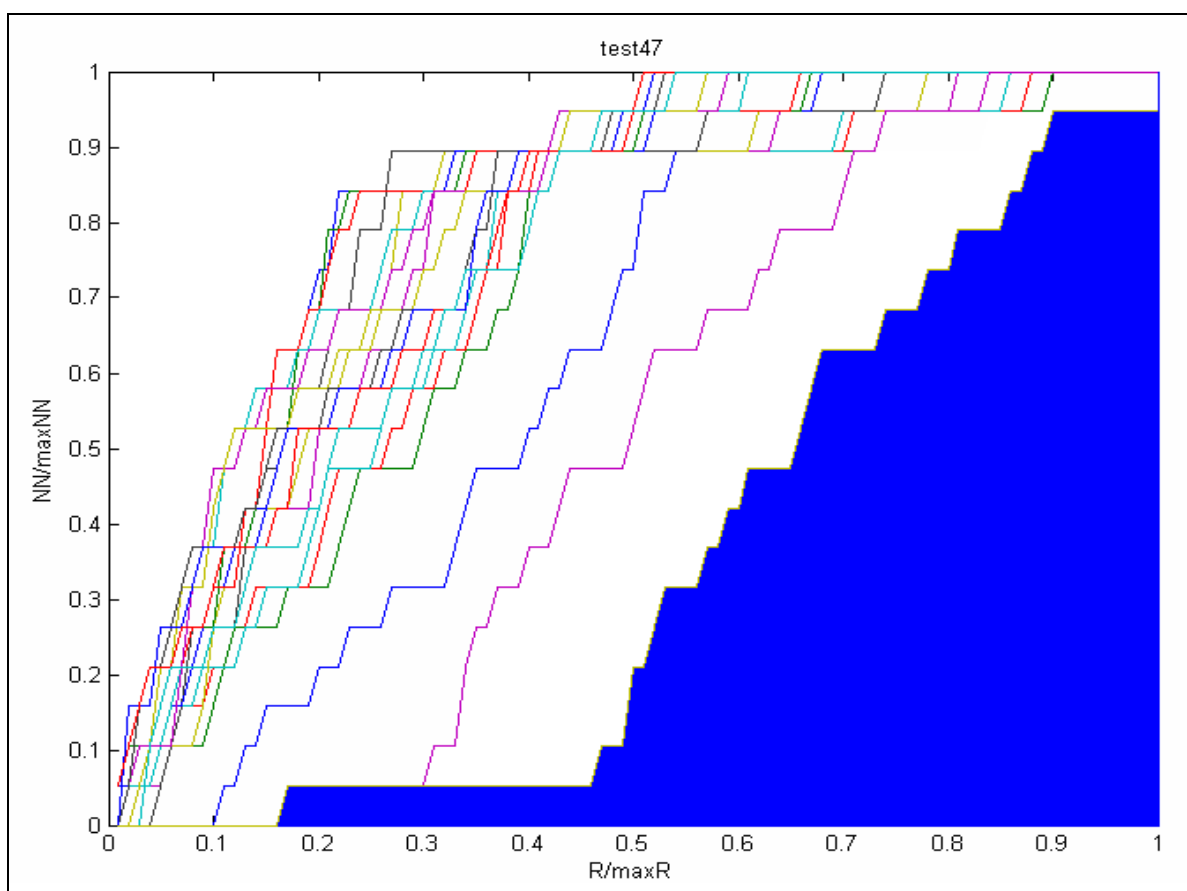


Abbildung 6-4: Repräsentative R-NN Plots, für jeden Plot wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet.

Für jeden Datenpunkt erhält man dadurch einen neuen Wert ≥ 1 , der nun mit weiteren konventionellen Ausreißertests (entsprechend Kapitel 6.3) analysiert wird. Es wurden drei parametrische Tests (Generalisierter ESD-Test, Dixon-Test und Nalimov-Test) sowie zwei Ausreißertests der robusten Statistik, nämlich der Boxplot und der MAD-Test durchgeführt.

Die Auswirkung des Algorithmus von Guha und der AUC-Berechnung wird in der Abbildung 6-5 dargestellt. Primär werden die „Ausreißer“ nicht von den „Nicht-Ausreißern“ separiert, sondern die „Nicht-Ausreißer“ werden verstärkt gruppiert. Die Abweichung innerhalb dieser Gruppe wird verringert und hat damit zur Folge, dass die „Ausreißer“-Werte stärker „auffallen“.

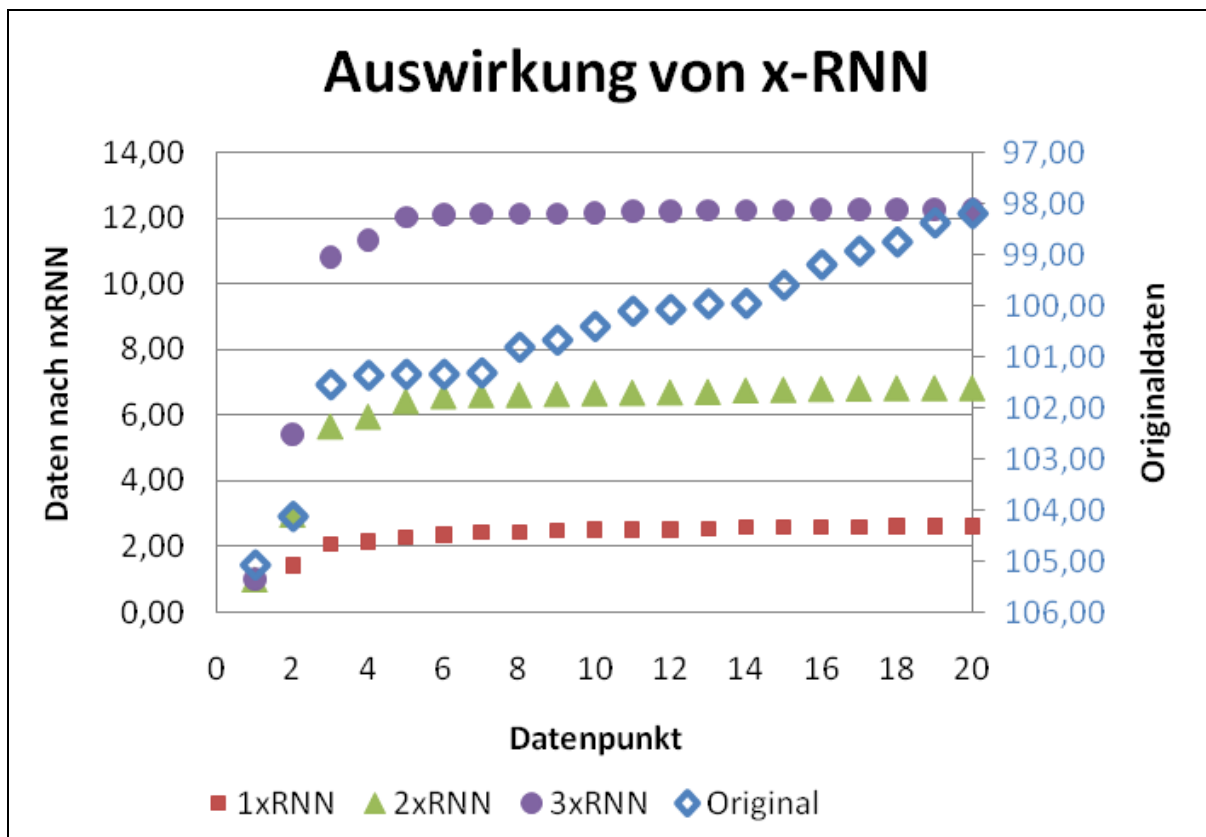


Abbildung 6-5: Auswirkung des RNN-Algorithmus auf einen Datensatz mit 2 Ausreißern (Datenpunkte 1 und 2). Originaldaten (Achsenbeschriftung rechts) und die nach nxRNN generierten neuen Werte (Achsenbeschriftung links).

Die mehrfache Anwendung des oben beschriebenen Algorithmus scheint den Gruppierungs-Effekt zu verstärken. Daher wurden bis zu vier Wiederholungen des RNN-Algorithmus angewandt und die neuen Werte mit konventionellen Ausreißertests bewertet.

6.7 Beurteilung der Güte der Ausreißerdetektion: Empfängerarbeitscharakteristik-Kurve oder Receiver Operating Characteristics (ROC) Curves

Mit der ROC-Kurve wurde in der Wissenschaft bereits die Leistung von diversen Empfängervorrichtungen bewertet. Unter dem Begriff „Empfänger“ sind z. B. menschliche Probanden, Maschinen oder auch Testmethoden zu verstehen. Der Test dient zur Bewertung, wie gut der Empfänger Signale vom Hintergrundrauschen unterscheiden kann.

Bezogen auf die Ausreißer-Detektion wird eine Vierfeldertafel erstellt (Tabelle 6-3). Es wird unterschieden zwischen der wahren Datenlage (Ausreißer oder Nicht-Ausreißer) und des Test-Ausgangs (Test positiv: Es wurde ein Ausreißer detektiert; Test negativ: Es wurde kein Ausreißer detektiert).

Tabelle 6-3: Vierfelder-Tafel zur Erstellung der ROC-Kurven; unterschieden wird zwischen wahrer Datenlage (Ausreißer; kein Ausreißer) und Testausgang.

„Test positiv“ = Es wurde ein Ausreißer detektiert

„Test negativ“ = Es wurde kein Ausreißer detektiert

| | <u>Ausreißer</u> | <u>kein Ausreißer</u> |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| <u>Test positiv</u> | rp (richtige Entscheidung) | fp (Fehlentscheidung: falscher Alarm) |
| <u>Test negativ</u> | fn (Fehlentscheidung) | rn (richtige Entscheidung) |
| Summe | rp + fn | rn + fp |

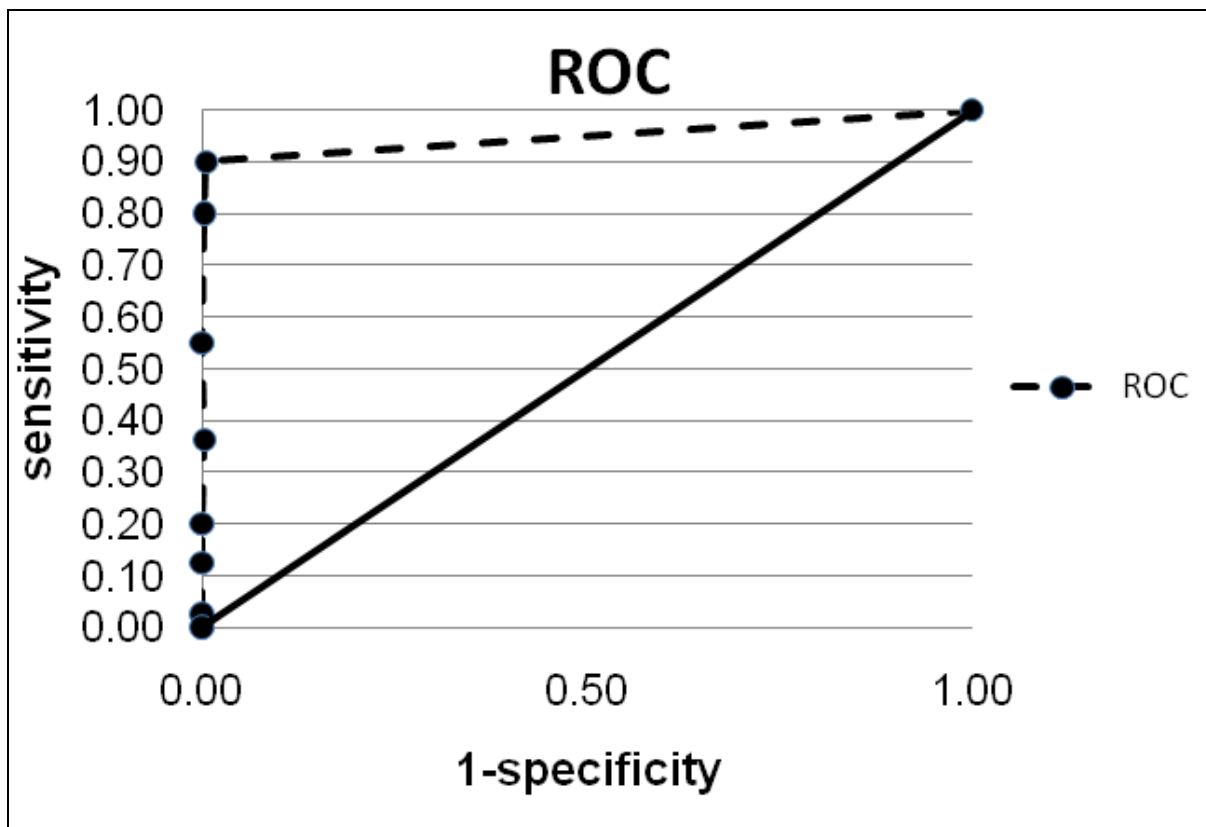


Abbildung 6-6: Ideale ROC-Kurve.

Wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben, können bei einem statischen Verfahren zwei Arten von Fehlern auftreten, der Fehler 1. Art („falscher Alarm“) und der Fehler 2. Art („Konsumentenfehler“). Danach wird die Häufigkeit der richtigen Signalerkennung, die Sensitivität (Gleichung 71), gegen die Häufigkeit des Fehlalarms (1-Spezifität) (Gleichung 72) aufgetragen.

$$1 - \text{Spezifität} = \frac{fp}{fp + rn} \quad (\text{Gleichung 71})$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{rp}{rp + fn} \quad (\text{Gleichung 72})$$

Die ideale Test-Methode besitzt eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität. Demnach würde die ROC-Kurve sehr nahe an der y-Achse verlaufen und der Sensitivitätswert würde gegen 1 gehen (Abbildung 6-6). Um eine effektive Testmethode gegen Zufallsergebnisse abzugrenzen, wird in das Diagramm ein Graph mit

der Steigung 1 eingezeichnet. Verlaufen die ROC-Kurven unterhalb dieser Gerade, gilt der Empfänger als unscharf, d. h. die Test-Ergebnisse sind bloß zufälliger Natur.

6.8 Beurteilung der Güte der Ausreißertests und ihrer Kombinationen mit dem R-NN Curve Algorithmus

Die nach Kapitel 6.4 erzeugten Datensätze wurden zunächst mit den konventionellen Ausreißertests analysiert. Um die Schärfe der Ausreißertests zu untersuchen, wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ gewählt. Jeder einzelne Punkt der ROC-Kurve wurde aus 20 Datensätzen mit einem Stichprobenumfang von $n = 20$ ermittelt. Wie die Stichproben unterliegen auch die Werte der ROC-Kurve statistischen Schwankungen (Abbildung 6-7 und Abbildung 6-8) [198]. Aufgrund dieser Schwankungen war eine AUC-Berechnung für die ROC-Kurven nicht möglich. Daher wurden sie visuell bewertet.

Der generalisierte ESD-Test, die Blockprozedur des Grubbs-Testes, war stark von dem „Swamping“-Effekt betroffen, d. h. es wurden oft zu viele Ausreißer detektiert. Der Dixon-Test war dann von dem Maskierungseffekt betroffen, wenn die Stichprobe mehr als 2 Ausreißer enthielt. Die Abbildung 6-7 zeigt die ROC-Kurven der einzelnen Ausreißertests mit den Original-Daten.

Bei der Untersuchung der Original-Daten mit einer Stichprobengröße $n = 20$ erwies sich der Nalimov-Test als schärfste Methode. Bis zu vier Ausreißer, also bis zu 20 % Kontaminanten, konnten mit ausreichender Sensitivität von ca. 0,9 erkannt werden. Auch für Stichproben mit 25 % Kontaminanten zeigte der Nalimov-Test noch eine Sensitivität von 0,77.

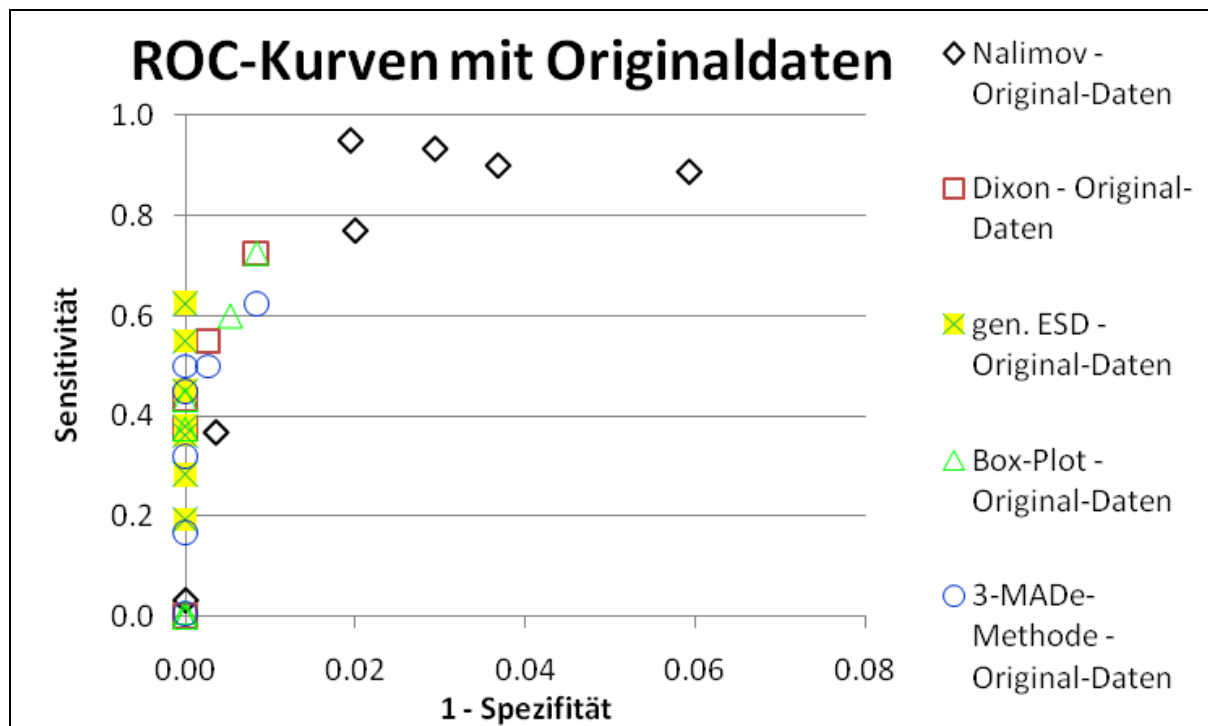


Abbildung 6-7: ROC-Kurven für die Ausreißer-Detektion mit den Original-Daten.

Die nächstbesten Ergebnisse zeigten der Box-Plot und der Dixon-Test. Bis zu 2 Ausreißer (10 %) konnten mit einer Sensitivität $> 0,7$ erkannt werden. Der generalisierte ESD-Test zeigte die höchste Spezifität, aber eine geringe Sensitivität. Auch der 3-MAD_E-Test konnte nur bis zu drei Ausreißer (15 %) mit einer Sensitivität von 0,5 detektieren.

Durch Guha's R-NN-Algorithmus werden die Nicht-Ausreißer stärker gruppiert und so von den Ausreißern separiert (Abbildung 6-5). Aufgrund der verstärkten Gruppierung und der verstärkten Schiefe der Datenverteilung waren die parametrischen Tests nicht durchführbar, denn diese setzen eine Normalverteilung voraus. Es wurden 50 % der Werte als Ausreißer detektiert. Daher waren die Kombinationen von Guha's Algorithmus mit den parametrischen Statistiktests nicht bewertbar.

Die robuste Statistik, die hier durch Box-Plot und die 3-MAD_E-Methode vertreten ist, ist in der Lage auch mit schiefen Verteilungen umzugehen [33]. In Kombination mit Guha's Algorithmus wurden die Teststärke (Sensitivität) und die Fähigkeit, wahre

Kontaminanten als Ausreißer zu erkennen, deutlich verbessert. Allerdings wurden hierbei niedrigere Spezifitätswerte beobachtet (Abbildung 6-8).

Eine erneute Anwendung des RNN-Algorithmus gruppiert die „Nicht-Ausreißer“-Gruppe noch stärker zusammen. Daher wurde der R-NN-Algorithmus bis zu 4mal auf die Stichproben angewendet und die AUC-Berechnung durchgeführt. Eine erste Wiederholung (1 x R-NN) steigerte die Sensitivität der Testmethode deutlich (Abbildung 6-8). Mit einer Kombination aus einer zweifachen Anwendung des R-NN-Algorithmus und der 3-MAD_E-Methode wurde eine Sensitivität von 1 erreicht. Durch eine 3- und 4-fache Wiederholung des R-NN ließ sich die Sensitivität nicht mehr merklich verbessern.

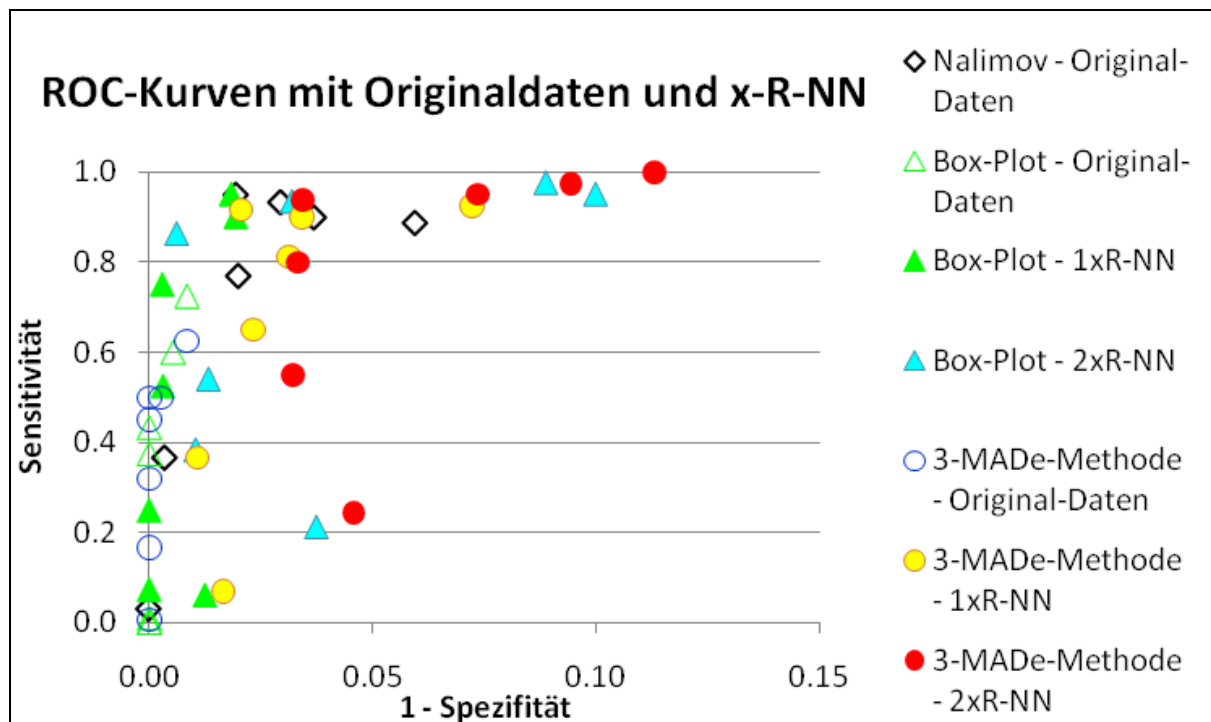


Abbildung 6-8: ROC-Kurven, Vergleich der Nalimov-Methode mit Box-Plot und 3-MAD_E nach Bearbeitung der Original-Daten mit dem R-NN Algorithmus.

6.9 Zusammenfassung

Ausreißer sind Werte, die nicht zu den restlichen Werten einer Grundgesamtheit passen und auffällig sind. Die Ursache muss genau untersucht werden [193].

In experimentellen Labordaten sind im Normalfall weniger als 20 % Ausreißer zu erwarten. Anderenfalls muss das angenommene Verteilungsmuster (Normal-, Log-Verteilung etc.) oder auch die Datenqualität überprüft werden [199]. In der Routine-Analytik sind noch kleinere Kontaminationsraten von 2 – 3 % zu vermuten [200]. Hier spielt aber die kleine Datenzahl n eine entscheidende Rolle. Z. B. ist es bei drei Werten unmöglich einen Wert als Ausreißer zu deklarieren. Um eine kleine Datenanzahl auf Ausreißer hin zu untersuchen, müssen entweder mehr Daten erzeugt werden oder es müssen Erfahrungswerte vorliegen. Häufig liegen Spezifikationsgrenzen aus vorherigen Untersuchungen vor.

Die Schärfe von konventionellen Ausreißertests (generalisierter ESD-Test, Dixon und Nalimov-Test) und Tests der robusten Statistik (Box-Plot und 3-MAD_E-Test) sowie ihrer Kombination mit einem Algorithmus aus der Chemometrik, R-NN-Algorithmus [37], wurde untersucht.

Von den konventionellen Ausreißer-Methoden zeigte der Nalimov-Test die höchste Schärfe in der Ausreißer-Detektion für die Original-Daten. Die Vorbehandlung der Original-Daten mit dem R-NN-Algorithmus verbesserte die Sensitivität von der 3-MAD_E-Methode und vom Box-Plot signifikant (Abbildung 6-8). Vor allem in der Detektion von multiplen Ausreißern ist entweder die Kombination von R-NN Algorithmus mit Box-Plot oder der 3-MAD_E-Methode die Methode der Wahl.

Für eine Routine-Analytik, bei der nur eine niedrige Ausreißerrate zu erwarten ist, ist der Nalimov-Test die Methode der Wahl. Für komplexere Fragestellungen mit einer höheren Kontaminationsrate oder für biologische Tests ist eine Kombination aus den R-NN Plots und dem Box-Plot oder der 3-MAD_E-Methode vorzuziehen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Um die Präzision der Gelelektrophorese zu verbessern und sie auch quantitativ in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle einzusetzen, sind Standardarbeitsanweisungen (SOPs) unverzichtbar: Mit ihnen lassen sich möglichst alle Parameter des komplexen Arbeitsablaufes konstant halten. Auch die Proteomics Standards Initiative (PSI) der Human Proteome Organisation (HUPO), der internationalen Proteomforschungsorganisation, brachte 2007 einen Leitfaden zur besseren Dokumentation für Versuchsbedingungen heraus, damit Ergebnisse unterschiedlicher Forschungseinrichtungen besser miteinander verglichen werden können [153].

Um die Variabilität zu mindern, sind die Gele einer Versuchsserie mit einer einzigen Färbelösungs-Charge zu färben. Hierzu sind große Lösungsmittel- und Färbelösungs-Chargen herzustellen. Der Grund für die Charge-zu-Charge-Variabilität konnte nicht vollständig geklärt werden. Färbelösungen, die mit den gleichen Chemikalien und Reagenzien von unterschiedlichen Analytikern hergestellt wurden, wiesen ähnliche UV-VIS-Absorptionsspektren auf. Wahrscheinlich sind die Chargenunterschiede der verwendeten Reagenzien die Ursache für die Variabilität.

Mit Hilfe von SOPs und unter Anwendung der VIS-NIR-Detektion, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich gegenüber der VIS-Detektion für Coomassie-gefärbte Proteine erhöht, konnte eine $RSD\%_{\text{pooled}}$ von 1,4 – 3 % für die eindimensionale Trennung mit SDS-PAGE erreicht werden [24]. Damit sind wir den pharmazeutischen Anforderungen an die Präzision einer analytischen Methode [10] sehr nahe gekommen. Bisher wurden relativ einfache Modell-Proteinmischungen untersucht. Der nächste Schritt wird die Übertragungen der erzielten hohen Präzision auf komplexere Proteingemische (z. B. Seren) sein. Hier wird u. a. die Probenvorbereitung eine entscheidende Rolle spielen.

Die Einhaltung von SOPs ist für die 2-D- Trennung (IEF-SDS-PAGE) von noch größerer Bedeutung, weil die Methode komplexer ist und sich der Gesamtfehler nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz aus der Summe der Variabilitäten der Einzelschritte zusammensetzt [116]. Manche Proteine werden nach der 2-DE in meh-

rere Spots (Engl.: charge trains) aufgetrennt. Diese besitzen scheinbar ähnliche Massen, unterscheiden sich aber in ihren isoelektrischen Punkten und erscheinen auf 2-D Gelen in Form eines horizontalen Protein-Stranges, der an eine Perlenkette erinnert [26].

Nicht jeder Spot auf einem 2-D-Gel ist eine neue Isoform eines Proteins aufgrund eines PTMs [30, 172], denn für viele Spots konnten mittels MS keine Modifizierung der Proteinprimärstruktur festgestellt werden. Einzelne Proteinspots aus Protein-Strängen konnten mit einer Re-Elektrophorese, die eine Wiederholung des IEF-SDS-PAGE darstellt, wieder in mehrere Spots aufgetrennt werden [25]. Mit der Re-Elektrophorese lassen sich Konformere bzw. Komplexe nachweisen [30, 178].

Daher sollen Quantifizierungsmethoden angepasst werden. Für bekannte Proteine mit „Perlenketten-Phänomen“ soll, wenn mittels MS kein Unterschied festgestellt wurde, die ganze Spotgruppe zusammen integriert werden. Somit konnte eine $RSD\%_{\text{pooled}}$ von 10 % erreicht werden. Handelt es sich um wirkliche Isoformen, ist eine Quantifizierung der einzelnen Spots sinnvoll.

In Bezug auf die 2-DE ist noch nicht geklärt, was die hohe schwankende Hintergrundfärbung im Bereich der kleineren Proteine verursacht. Mögliche Ursachen sind Salze wie z. B. Carrierampholyte, die dem IPG-Puffer zugesetzt werden. Ein weiteres Ziel ist die Optimierung der Trennung für monoklonale Antikörper, die bekannt für ihre zahlreichen PTMs sind.

Die Detektion von mehreren Ausreißern in einem Datensatz ist immer noch eine Herausforderung. Visuelle Methoden wie der Box-Plot tragen zu einem Gesamtüberblick über die Datenlage bei [190]. Für einfache Datensätze mit einer Kontaminationsrate $< 10\%$ ist der Nalimov-Test die Methode der Wahl. Handelt es sich um komplexere Daten, z. B. biologische Testungen, bei denen auch eine höhere Kontamination zu erwarten ist, ist der mehrfache Einsatz des R-NN-Algorithmus zusammen mit dem Box-Plot oder der MAD-Methode durchzuführen.

Allerdings darf der Ausreißer nicht grundlos bloß auf Grundlage des Testergebnisses aus der Messreihe entfernt werden. An erster Stelle steht die Ursachenklärung [122].

8. Experimenteller Teil

8.1 Apparative Ausstattung und Software

8.1.1 1-D-Gelelektrophorese-Systeme

- Biometra Minigel-Twin, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
- Spannungsquelle:
 - Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
 - Electrophoresis Power Supply EPS 300, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
 - Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

8.1.2 2-D-Gelelektrophorese-Systeme

- IPGphor™ - IEF System für die Trennung in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung), GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
- IsoDalt Electrophoresis System (vertikales System) für die Trennung in der zweiten Dimension (SDS-PAGE), Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Gradientenmischer: IsoDalt System, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA
- Kühlungssystem: Haake F3 Fisons, Thermo, Karlsruhe, Deutschland
- Spannungsquelle: Hoefer EPS 2A 200, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA

8.1.3 Scanner und Detektoren

- Power Look III Scanner, Umax, Willich, Deutschland (Detektorsoftware: Silver Fast)
- Odyssey Infrared Imaging System, LiCor Biosciences, Lincoln, NE, USA (Detektorsoftware: Application Software Version 3.0)
- Starion IR Multi Color Fluoreszenz Scanner (FLA-9000 Reader), Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland (Detektorsoftware: Multigauge)

8.1.4 Weitere Geräte

- UV-VIS-Spektrometer:
 - Specord 40, Analytik Jena, Jena, Deutschland
- Eppendorfpipetten:
 - Eppendorf 2-20 µl, 10-100 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Horizontal-Schüttler:
 - Bühler Schüttler SM 25, Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen, Deutschland
 - GFL 3016, Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
 - Bühler Kombischüttler KL2, Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen, Deutschland

8.1.5 Software

- Delta2D Version 3.4, Decodon GmbH, Greifswald, Deutschland
- Matlab R2007b, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA
- Correct Integration Software System (CISS), AK Wätzig [201]

8.2 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Tabelle 8-1: Verwendete Reagenzien.

| Reagenz | Hersteller | Artikelnummer |
|---|---|---------------|
| Agarose | Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland | 11408 |
| Aluminiumsulfat- Hexadecahydrat | Fluka, Steinheim, Deutschland | 06421 |
| Ammoniumpersulfat | Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg, Deutschland | 13375 |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt, Deutschland | 1.11746 |
| 2-Butanol | Merck, Darmstadt, Deutschland | 1.00984 |
| CHAPS | Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland | 50058-2 |
| Coomassie Brilliant Blue - G250 | Serva Elektrophorese GmbH, Heidel- berg, Deutschland | 17524 |
| DTT | Serva Elektrophorese GmbH, Heidel- berg, Deutschland | 20710 |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 3738.5 |
| Ethanol, tech. Grad | Helmholtz-Zentrum für Infektionsfor- schung, Braunschweig, Deutschland | - |
| Ethanol, absolut | J. T. Baker, Deventer, Niederlande | 8006 |
| Ethanol, HPLC-Grad | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland | 34852 |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 4043.3 |
| Glycin | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 3908.2 |
| Harnstoff | BioRad, München, Deutschland | 161-0731 |
| Imidazol | Serva Elektrophorese GmbH, Heidel- berg, Deutschland | 26081 |
| Immobiline™ Dry Strip pH 3-10 NL (180 x 3 x 0,5 mm) | Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland | 17-1234-01 |
| Iodacetamid | Fluka, Steinheim, Deutschland | 57670 |
| IPG-Puffer pH 3-10 NL | Amersham Biosciences, Freiburg, | 17-6000-87 |

| | | |
|------------------------------|--|----------------|
| | Deutschland | |
| β-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt, Deutschland | 444204 |
| Methanol | J. T. Baker, Deventer, Niederlande | 8045 |
| Natronlauge | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 6771.1 |
| Phosphorsäure | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 9079.2 |
| cOmplete Mini, EDTA-free | Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland | 11 873 580 001 |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 3029.1 |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt, Deutschland | 1.09060 |
| SDS | BioRad, München, Deutschland | 161-0302 |
| Silikonöl | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 4025.1 |
| TEMED | Roth, Karlsruhe, Deutschland | 2637.1 |
| Thioharnstoff | Fluka, Steinheim, Deutschland | 88810 |
| Tris Ultrapure | Molekula, Vaterstetten, Deutschland | 11942384 |
| Zinksulfat-Heptahydrat | Merck, Darmstadt, Deutschland | 1.08883.1000 |

Tabelle 8-2: Verwendete Fertiglösungen.

| Reagenz | Hersteller | Artikel-Nummer |
|----------------------------|----------------------------|----------------|
| XT Sample Buffer | Bio-Rad, Hercules, CA, USA | 161-0791 |
| Mark12™ Unstained Standard | Invitrogen, CA, USA | LC5677 |
| SimplyBlue™ SafeStain | Invitrogen, CA, USA | LC6060 |

8.3 1-D-Gelelektrophorese (1-DE)

8.3.1 Probenvorbereitung

Zur Untersuchung wurde die gebrauchsfertige Proteinstandarlösung Mark12™ unstained Standard Solution verwendet (Tabelle 8-3). Zwei Teile der Proteinstandarlösung wurden mit je 1 Teil Wasser und XT Sample Buffer verdünnt. In jede Gel-tasche wurden jeweils 8 µl dieser Lösung aufgetragen.

Tabelle 8-3: Zusammensetzung der Mark12™ Unstained Standard Solution, relatives Molekulargewicht und Konzentration der Proteine, die bezifferten Proteine wurden quantitativ ausgewertet.

| Protein | Mr [kDa] | Konzentration [µg/µl] |
|----------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Myosin | 200,0 | 0,076 |
| β-Galaktosidase (1) | 116,3 | 0,040 |
| Phosphorylase b (2) | 97,4 | 0,070 |
| Bovines Serum Albumin (3) | 66,3 | 0,040 |
| Glutamatdehydrogenase (4) | 55,4 | 0,120 |
| Laktatdehydrogenase (5) | 36,5 | 0,080 |
| Carboanhydrase (6) | 31,0 | 0,044 |
| Trypsininhibitor (7) | 21,5 | 0,064 |
| Lysozym | 14,4 | 0,050 |
| Aprotinin | 6,0 | 0,076 |
| Insulin B Kette | 3,5 | 0,143 |
| Insulin A Kette | 2,5 | 0,085 |
| Gesamtkonzentration | | 0,888 |

8.3.2 SDS-PAGE

Für die Elektrophorese wurden selbst hergestellte diskontinuierliche 10 % SDS-PAGE Gele (8,6 x 7,7 x 0,1 cm) verwendet. Die für die Herstellung der Gele (Tabelle 8-2) benötigte APS-Lösung wurde wöchentlich frisch hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung des wassergesättigten 2-Butanols (Tabelle 8-5) wurde 2-Butanol mit dem gleichen Volumen an Wasser vermisch. Nach mindestens 24 Stunden wurde die obere Phase verwendet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach 2 Stunden wurde das 2-Butanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach einer Stunde wurden die Gele für den Elektrophoreselauf verwendet. Während der Polymerisation dürfen die Gießkammer nicht berührt werden, um Luftblasenbildung in den Gelen zu vermeiden.

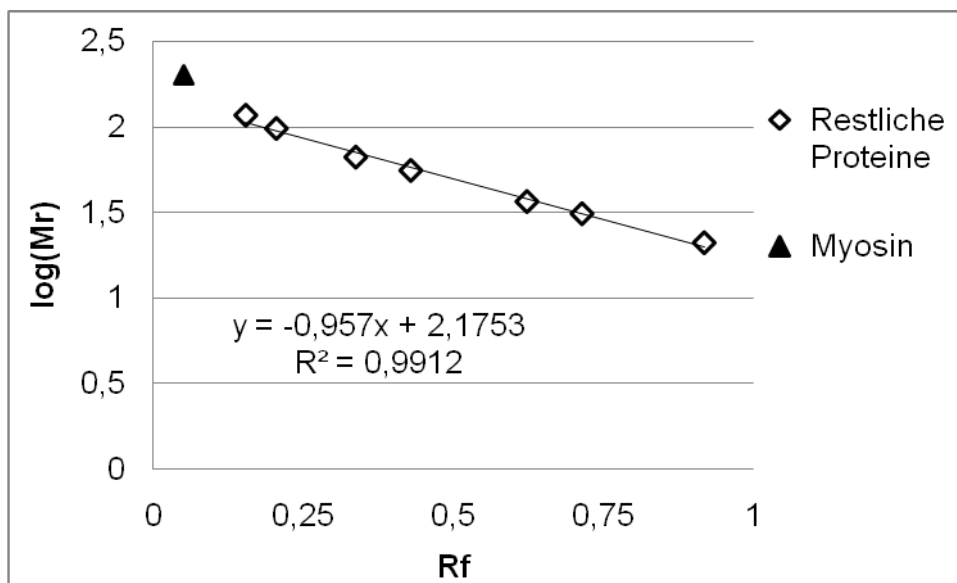


Abbildung 8-1: Myosin (schwarzes Dreieck) liegt außerhalb des linearen Bereiches eines 10% SDS-PAGE.

Der Lauf erfolgte in Biometra Minigel-Twin-Laufkammern, der SDS-Laufpuffer wurde vor der Verwendung im Verhältnis 1 zu 10 mit Wasser verdünnt. Zu Beginn des Laufes wurde eine Spannung von 80 V angelegt, die nach 15 Minuten auf 120 V erhöht wurde. Sobald die blaue Laufront fast das Gelende erreicht hatte, wurde der Elektrophoreselauf gestoppt.

Tabelle 8-4: Zusammensetzung der selbstgegossenen SDS-PAGE-Gele.

| Lösungen | Trenngel (10 %) | Sammelgel (4 %) |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| Wasser | 6,95 ml | 6,20 ml |
| Acrylamidlösung 30 % | 5,30 ml | 1,40 ml |
| 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8) mit SDS | 3,75 ml | - |
| 0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) mit SDS | - | 2,50 ml |
| 10 % (m/v) APS | 75 µl | 80 µl |
| TEMED | 30 µl | 50 µl |

Tabelle 8-5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

| Puffer | Reagenzien | |
|---------------------------------------|-----------------------|---|
| 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8 mit SDS | TRIS SDS HCl | 181,7 g/L 4,0 g/L auf pH 8,8 einstellen |
| 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8 mit SDS | TRIS SDS HCl | 60,6 g/L 4,0 g/L auf pH 6,8 einstellen |
| SDS-Laufpuffer (10 x) | TRIS Glycin SDS | 29 g/L 149,8 g/L 1,0 g/L |
| Wasser-gesättigtes 2-Butanol | 2-Butanol Wasser | 50 % (v/v) 50 % (v/v) |

8.3.3 Färbung

Nach dem Elektrophorese-Lauf wurden die Sammelgele von den Trenngelen getrennt und verworfen. Die Trenngele wurden über Nacht in einer Fixier-Lösung geschwenkt. Danach wurden die Gele zweimal für je 10 Minuten mit Wasser gewaschen. Das Färben erfolgte mittels kolloidaler Coomassie-Lösung nach dem Protokoll von Kang et al. [90] für 23 Stunden (Tabelle 8-6). Nach dem Schwenken der Gele für 50 Minuten in einer Entfärbe-Lösung wurden sie über Nacht mit Wasser entfärbt. Alle Schritte (Fixierung, Färbung und Entfärbung) erfolgten fortwährend unter Schütteln.

Tabelle 8-6: Zusammensetzung der für die Färbung und Entfärbung verwendeten Lösungen.

| Lösungen | Reagenzien |
|--|--|
| Kolloidale Coomassie-Färbelösung nach Kang [90] | 5 % (w/v) Aluminiumsulfat 10 % (v/v) Ethanol 96 % 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 85 % 0,02 % (w/v) CBB G-250 |
| Fixier-Lösung | 30 % (v/v) Ethanol 96 % 10 % (v/v) Essigsäure |
| Entfärbe-Lösung | 10 % (v/v) Ethanol 96 % 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 85 % |

8.3.4 Detektion

Es wurden zwei Detektoren unterschiedlicher Hersteller verwendet: Odyssey Infrared Imaging System (LiCor Biosciences, Lincoln, NE, USA) und Fluorescent Image Analyzer Fla-9000 (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Für das Odyssey Infrared Imaging System wurde der 700 nm Kanal und eine Auflösung von 150 dpi gewählt. Für den Fluorescent Image Analyzer Fla-9000 wurde folgende Einstellung gewählt: 685 nm Laser, BPFR700-Filter, 254 dpi Auflösung und 900V Photomultiplier-Tube (PMT). Jedes Gel wurde dreimal gescannt.

8.3.5 Bildverarbeitung

Jedem Graustufenwert der tiff-Bilder wurde durch MATLAB jeweils eine Zahl zugeordnet und die Bilder wurden in dimensionsreduzierte Elektropherogramme umgewandelt. Die Farbtiefe wird über die Abstufungen der Grauwerte bestimmt. Ideal sind daher 16-bit-Bilder, die bis zu $2^{16} = 65536$ Farbabstufungen erlauben. Die Integration

der Elektropherogramme erfolgte mit dem Arbeitskreisinternen Programm Korrekt-Integrations-Software-System (KISS) [201] (Abbildung 8-2).

8.3.6 Einfluss der Temperatur auf die Präzision während Färben und Entfärben

Es wurde der Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen auf die Präzision untersucht. Die Gele wurden bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie bei konstanter Schüttelgeschwindigkeit entweder bei Raumtemperatur oder im Kühlraum (4 °C) in einer CCB-Lösung nach Kang [90] gefärbt und wieder entfärbt.

8.3.7 Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit während des Färbens und Entfärbens auf die Präzision

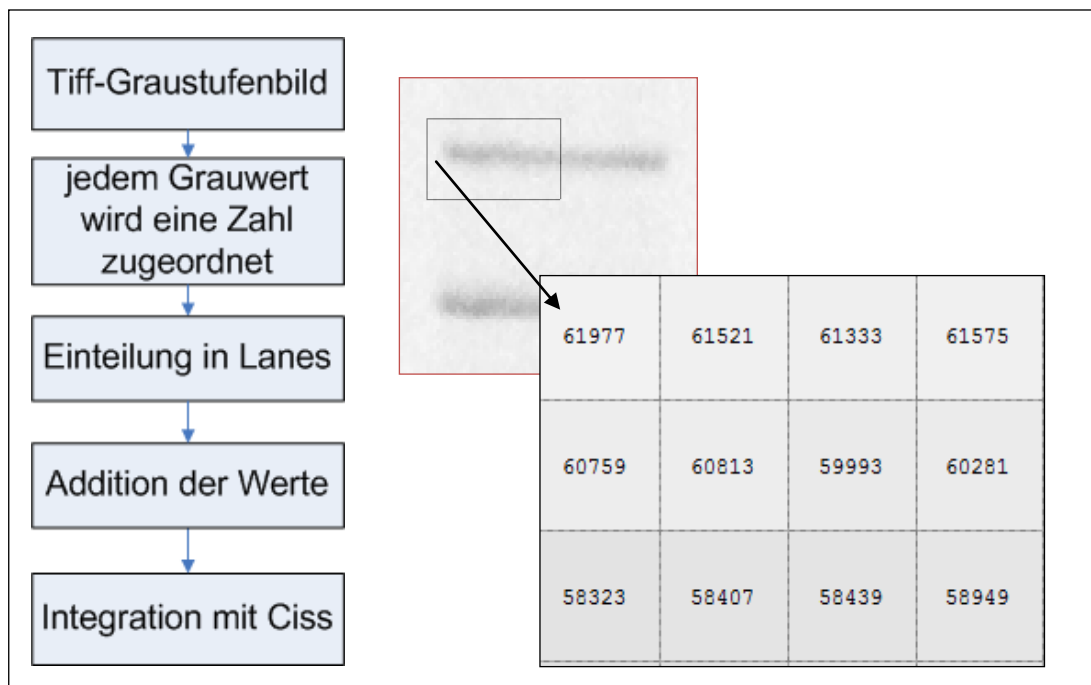


Abbildung 8-2: Bild-Auswertungsverfahren, zu sehen ist ein Ausschnitt einer Bande mit zugehörigen Graustufenwerten.

Der Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit während des Färbens und Entfärbens auf die Präzision wurde untersucht, indem die Gele bei Raumtemperatur bei zwei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten (30 min^{-1} oder 50 min^{-1}) gefärbt und wieder entfärbt wurden.

8.3.8 Abhängigkeit der Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung von der Zeit, Reagenzien und Analytiker

Zur Untersuchung des Parameters des Analytikers wurde die CCB-Lösung nach Kang [90] von zwei Analytikern jeweils nach Anleitung [92] hergestellt und gelagert. Eine weitere Färbelösung wurde mit dem Ethanol p. a. hergestellt. Des Weiteren wurden auch 2 kommerzielle Coomassie-Lösungen SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, CA, USA), wovon eine neu und die andere 1 Jahr alt war, vermessen.

Die selbsthergestellten Lösungen wurden ohne Verdünnung, aber nach Filtration mit einem UV-VIS-Spektrometer im Wellenlängenbereich von 200 – 800 nm vermessen. Die kommerziellen Lösungen wurden vor der Messung im Verhältnis 2 zu 5 verdünnt.

8.4 2-D-Gelelektrophorese (2-DE)

8.4.1 Gießen der SDS-PAGE-Gradientengele

Die Gele müssen mindestens einen Tag vor der Verwendung vorbereitet werden. Nach dem Gießen sind sie zwei Wochen lang verwendbar. Der Hoefer Dalt Gelgieß-Stand wird nach Anleitung aufgebaut [202]. Es können bis zu 23 Gele ($23 \times 19 \times 0,15 \text{ cm}$) gleichzeitig gegossen werden. Zur Markierung der einzelnen Gele wurden beschriftete Papierschnipsel in die dem Lösungsmittelzulauf abgewandte Seite eingeführt.

Tabelle 8-7: Lösungen für die Herstellung der SDS-PAGE Gele.

| Lösung | Reagenzien | | Lagerung |
|---|--|---|---|
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 | Tris Salzsäure Wasser | 545 g auf pH 8,8 einstellen ad 3000 ml | 4 °C |
| 10 % (m/v) SDS-Lösung | SDS Wasser | 10 g ad 100 ml | Raum- temperatur |
| Ausgleichslösung (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 50 % (v/v) Glycerol, Bromphenolblau) | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 Glycerol Bromphenolblau Wasser | 50 ml 100 ml 2 mg ad 200 ml | vor der Verwendung frisch herstellen |
| Überschichtungslösung (0,1 % (m/v) SDS- Lösung) | 10 % (m/v) SDS- Lösung Wasser | 5 ml ad 500 ml | Raum- temperatur |
| Gel-Lagerungslösung (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (m/v) SDS) | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 10 % (m/v) SDS- Lösung Wasser | 500 ml 20 ml ad 2000 ml | 4 °C |
| 10 % (m/v) APS-Lösung | APS Wasser | 2 g ad 20 ml | direkt vor dem Gießen herstellen |
| 10 % (v/v) TEMED- Lösung | TEMED Wasser | 0,5 ml 4,5 ml | |

Während der 1,5 M Tris-Cl-Puffer, die SDS-Lösung, Übersichtungs- und Lagerungslösung im Voraus hergestellt werden können, müssen die Ausgleichslösung sowie die APS- und TEMED-Lösung direkt vor dem Gießen der Gele frisch hergestellt werden (Tabelle 8-7). Die Mischung aus Acrylamidlösung, Tris-HCl-Puffer, Wasser, SDS-Lösung und gegebenenfalls die Glycerol-Lösung (Tabelle 8-8) werden unter Vakuum für 10 Minuten entgast. Als „schwere Lösung H“ wird die Gel-Herstellungslösung mit höherer Dichte bezeichnet, die Glycerol enthält. Bis zur Verwendung werden die Gel-Herstellungslösungen im Kühlschrank gelagert.

Der Gelgießstand wird zusammen mit dem Gradientenmischer unter einem Abzug aufgebaut, weil Acrylamidmonomere neurotoxisch wirken. Der Gradientenmischer, der aus einer Kammer für die leichte und schwere Lösung und einem Y-Schlauch besteht, funktioniert nach dem hydrostatischen Prinzip (Abbildung 8-3).

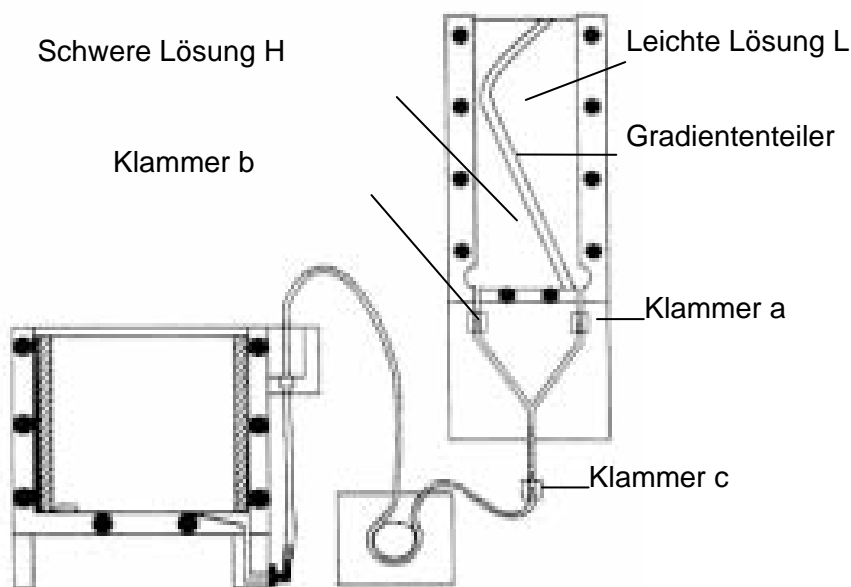


Abbildung 8-3: Aufbau eines Gelgießstandes mit Gradientenmischer, aus [202].

Das Ende des Y-Schlauches führt zum Einlass des Gelgießstandes. Der Trog wird mit der Ausgleichslösung befüllt. Zunächst wird die Mischung für die leichte Gelgießlösung (Lösung L) vorbereitet und die APS-Lösung mit der TEMED-Lösung hinzugefügt. Nach zwei minütigem Mischen wird diese vollständig in den Gradientenmischer eingefüllt. Darauf wird die Klammer a vorsichtig geöffnet und der obere Abschnitt des

Y-Schlauches mit der Gellösung befüllt. Um einen gleichmäßigen Lösungsmittelfluss zu gewährleisten, werden evtl. vorhandene Luftblasen durch leichtes Drücken in Richtung der Kammer entfernt. Daraufhin wird der Zulauf b vorsichtig geöffnet, bis der Y-Schlauch komplett gefüllt ist und wieder verschlossen.

Nun wird durch Zugabe der APS- und TEMED-Lösungen die schwere Lösung (Lösung H) hergestellt. Es wird so viel Lösung H in den Gelgießstand gefüllt, bis der Flüssigkeitspegel ca. 2 cm unter dem der Lösung L liegt. Die Zuläufe c und a werden nacheinander vorsichtig geöffnet. Wenn der Flüssigkeitspegel der Lösung L 1 cm über dem der Lösung H liegt, wird der Zulauf b geöffnet und die Lösung H kann in den Gießstand fließen. Liegt der Pegel ca. 1,5 cm unter der Gelkassettenoberkante, wird Zulauf c geschlossen. Der Mischerschlauch wird aus dem Einlass entfernt und gleichzeitig tritt nun die Ausgleichslösung in den Gießstand ein. Die übriggebliebene Lösung im Gradientenmischer wird in ein Abfallgefäß abgelassen und die Kammer wird zweimal mit Wasser gespült, um Gel-Lösungsreste zu entfernen und Adsorption an den Oberflächen zu verhindern.

Um eine ebene Geloberkante zu erhalten, werden die Gele frontal im 30°-Winkel mit einer Gelüberschichtungslösung, 0,1 % (w/v) SDS-Lösung, großzügig besprüht. Die Gelgießkammer wird mit einem mit Überschichtungslösung befeuchteten Papiertuch und einer Glasplatte abgedeckt und über Nacht zum Auspolymerisieren gelagert.

Am nächsten Tag wird zuerst die Ausgleichslösung abgelassen und die Gel-Kassetten aus dem Gießstand genommen. Die Gele werden in Boxen mit Gel-Lagerungslösung überschichtet und bis zur Verwendung in einem Kühlraum aufbewahrt.

Tabelle 8-8: Zusammensetzung der Lösungen zur Gel-Herstellung.

| Reagenzien und Lösungen | Leichte Gel-Lösung (10 %) | Schwere Gel-Lösung (15 %) |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 30 % (m/v) Acrylamid-Lösung | 357 ml | 536 ml |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 | 275 ml | 275 ml |
| Wasser | 444 ml | 196 ml |
| 10 % (m/v) SDS-Lösung | 11,0 ml | 11,0 ml |
| 100 % (v/v) Glycerol | - | 76,6 ml |
| 10 % (m/v) APS-Lösung | 11,0 ml | 5,50 ml |
| 10 % (v/v) TEMED | 1,88 ml | 0,42 ml |

8.4.2 Vorbereitung zur IEF

Die erste Dimension der 2-DE, die IEF(Isoelektrische Fokussierung), wurde mit IPGphor™-IEF System (GE Healthcare, Piscataway, NY, USA) unter Verwendung von Fertiggelelektrophorese, IPG-Strips, durchgeführt und die zweite Dimension, die SDS-PAGE, wurde mit der vertikalen Elektrophorese kammer IsoDalt Electrophoresis System (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) durchgeführt.

Tabelle 8-9: Verwendete Proteine und Protein-Standardlösungen.

| Protein | Hersteller | Artikelnummer |
|--|---------------------------------------|----------------------|
| Albumin (Rinderserum) | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland | A7638 |
| β -Lactoglobulin (Kuhmilch) | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland | L2506 |
| Myoglobin (Pferdemuskel) | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland | M1882 |
| Carboanhydrase I (humane Erythrozyten) | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland | C6653 |
| Ovalbumin (Hühnereiweiß) | Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland | A5503 |
| Matuzumab (monoklonaler Antikörper) | Merck Serono, Darmstadt, Deutschland | 1.13327.0009 |
| Mark12™ Unstained Standard | Invitrogen, CA, USA | LC5677 |

Tabelle 8-10: Zusammensetzung der Quell- und Äquilibrierlösung für die 2-DE.

| Quelllösung | Äquilibrierlösung |
|--|---|
| 7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS 0,46 % (w/v) DTT 0,5 % (v/v) IPG Puffer 0,006 % (w/v) Bromphenolblau 1 Tab. cOmplete Mini, EDTA-free / 20 ml | 50 mM Tris-Cl 6 M Harnstoff 30 % (m/v) Glycerin 2 % (m/v) SDS Direkt vor Verwendung: + 1 % (m/v) DTT oder 4,8 % (m/v) Iodacetamid |

Die Keramikscheffchen des IPGPhor-Systems und ihre Abdeckungen werden mit einer 10 % (w/v) SDS-Lösung gereinigt. Nach dem Spülen mit Wasser werden sie mit reinem Ethanol versetzt und trocknen gelassen. Unmittelbar vor der IEF werden Filterpapier-Elektrodenplättchen auf die Elektroden des Keramikscheffchens platziert und mit je 20 μ l Quell-Lösung (Tabelle 8-10) befeuchtet.

8.4.3 Experiment 1: Temperatureinfluss auf 2-DE

8.4.3.1 IEF

20 µg BSA wurde in Quell-Lösung gelöst und die IEF wurde durch In-Gel-Rehydrierung bei 20, 25 und 30 °C durchgeführt. Nach 2 Stunden spannungsloser Quellung wurden die Proteine mit dem IEF Programm (Tabelle 8-11) bei maximalem Stromfluss von 45 µA bis zu einer Gesamtvoltstundenzahl von 200 kVh fokussiert.

Tabelle 8-11: Programm für die IEF.

| Schritt | Zeit [h] | Spannung [V] | Art |
|---------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | 16 | 30 | Step-and-hold |
| 2 | 1 | 200 | Gradient |
| 3 | 1 | 200 | Step-and-hold |
| 4 | 1 | 500 | Gradient |
| 5 | 1 | 1000 | Gradient |
| 6 | 2 | 3500 | Gradient |
| 7 | 14 | 3500 | Step-and-hold |
| 8 | 2 | 8000 | Gradient |
| 9 | bis zum Ende | 8000 | Step-and-hold |

8.4.3.2 Äquilibration

Nach der IEF wurden die IPG-Streifen zunächst mit einer Äquilibration (Tabelle 8-10), die 1 % DTT (w/v) enthält, für 15 Minuten auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach wurden die IPG-Streifen für weitere 15 Minuten in einer Äquilibration, die statt des DTTs 4,8 % IAA enthält, geschüttelt.

8.4.3.3 SDS-PAGE

Tabelle 8-12: Lösungen für die 2. Dimension der 2-DE.

| Lösung | Reagenzien | |
|---------------------------------|--|--|
| SDS-Laufpuffer (10 x) | Tris Glycin SDS | 29 g/L 149,8 g/L 1,0 g/L |
| SDS-Laufpuffer (1 x) | SDS-Laufpuffer (10 x) | 1:10 verdünnen |
| 1 % (m/v) Agarose-Lösung | Agarose Bromphenolblau SDS-Laufpuffer (1x) | 1 g/100 ml 1 Spatelspitze ad 100 ml, aufkochen |

Nach der Äquilibration wurden die IPG-Streifen auf die Oberkante von selbstgegos- senen 12 – 15 % SDS-PAGE Gelen gebracht. Zusammen mit je einem Elektroden- plättchen, welches 10 µl Proteinstandardlösung Mark12™ Unstained Standard ent- hielt, wurden die IPG-Streifen mit einer 1 % Agaroselösung, die Bromphenolblau als Laufmarker beinhaltetete, fixiert (Tabelle 8-12).

Der SDS-Laufpuffer (10x) wurde vor der Verwendung im Verhältnis 1 zu 10 verdünnt. Der SDS-PAGE-Lauf erfolgte zunächst für eine Stunde bei 80 V, dann bei 100 V über Nacht bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreichte.

8.4.3.4 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang

Nach dem Lauf wurden die Gele in einer wässrigen Ethanol-Essigsäure-Lösung (sie- he Kapitel 8.3.3) fixiert. Die Gele wurden zweimal für je 10 Minuten in MilliQ Wasser gewaschen und mit einer CCB-Lösung nach Kang [90] gefärbt

(siehe Kapitel 8.3.3). Die Entfärbung erfolgte über 2 Tage in MilliQ Wasser. Die Fixierung, Färbung und Entfärbung wurden unter langsamem Schütteln durchgeführt.

8.4.3.5 Detektion

Die Gele wurden je dreimal mit dem Odyssey Infrared Imager unter folgenden Einstellungen eingescannt: 700 nm Kanal, 150 dpi Auflösung, Laserintensität 6 und Fokussierung 0,75 mm. Die Bilder wurden als tiff-Dateien gespeichert.

8.4.4 Experiment 2: Reproduzierbarkeit

8.4.4.1 IEF

Nach Zugabe einer Mischung von 52 μl Proteinlösung, die 20 μg BSA, 25 μg Ovalbumin, 5 μg β -Lactoglobulin, 6 μg Myoglobin und 15 μg Matuzumab enthält, zu 12,5 μl einer Carboanhydrase I – Lösung (CA I) (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μl 1 % (w/v) Bromphenolblaulösung, 2 μl IPG-Puffer pH 3 – 10 NL und 282 μl Rehydrierungspuffer wurde die IEF mit IPG-Streifen 3 – 10 NL nach einer modifizierten Anleitung von GE Healthcare (Tabelle 8-13) nach 6 Stunden stromloser Rehydrierung durchgeführt. Die CA I dient als Interner Standard.

Tabelle 8-13: Programm für die IEF.

| Schritt | Zeit [h] | Spannung [V] | Art |
|---------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | 10 | 30 | Step-and-hold |
| 2 | 1 | 500 | Step-and-hold |
| 3 | 1 | 1000 | Gradient |
| 4 | 3 | 8000 | Gradient |
| 5 | Bis zum Ende | 8000 | Step-and-hold |

Die IEF wurde so lange bei 20 °C und einem Maximalstrom von 40 μA durchgeführt, bis eine Gesamtvoltstundenzahl von 45 kVh erreicht war.

8.4.4.2 Äquilibration

Die Äquilibration wurde wie in Kapitel 8.4.3.2 beschrieben durchgeführt.

8.4.4.3 SDS-PAGE

Es wurden 10 – 15 % Gradientengele verwendet. Unter den Bedingungen wie in Kapitel 8.4.3.3 beschrieben wurde die SDS-PAGE durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Chargen mit je 6 Gelen unter permanenter Dokumentation der Spannung und des Stromverlaufes analysiert [181].

8.4.4.4 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang

Die CBB-Färbung erfolgte wie in Kapitel 8.4.3.4 beschrieben.

8.4.4.5 Detektion

Der Fluorescent Image Analyzer Fla-9000 (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurde unter folgenden Einstellungen verwendet: 685 nm Laser, BPFR700-Filter, 254 dpi Auflösung und 900V Photomultiplier-Tube (PMT). Jedes Gel wurde dreimal gescannt. Jeder Scan dauerte 10 Minuten.

8.4.4.6 Bildbearbeitung

Die tiff-Dateien wurden mit MATLAB eingelesen und in dimensionsreduzierte Elektropherogramme umgewandelt [18, 20, 24]. Die Elektropherogramme wurden mit KISS (Korrektes Integrations-Softwaresystem) integriert [201]. Jede Peakfläche wur-

de durch die Peakfläche des Internen Standards (Carboanhydrase I) geteilt, um die Scan-zu-Scan-Variabilität zu minimieren.

8.4.5 Experiment 3: Re-Elektrophorese

8.4.5.1 IEF und SDS-PAGE (1. Lauf)

Die IEF, Äquilibration und SDS-PAGE erfolgt wie unter Kapitel 8.4.4.1 – 8.4.4.3 beschrieben.

8.4.5.2 Imidazol-Zink-Färbung

Die Gele wurden nach dem SDS-Lauf ohne Fixierung in einer 1 % Natriumcarbonat-Lösung für 5 Minuten inkubiert. Danach wurden sie für 15 Minuten in einer SDS-haltigen 0,2 M Imidazol-Lösung (Tabelle 8-14) geschüttelt. Um das überschüssige Imidazol zu entfernen wurden die Gele für 30 Sekunden mit Wasser gewaschen. Nach Zusatz von 0,2 M Zinksulfatlösung werden die Gele für 1 Minute manuell geschüttelt, danach in Wasser überführt. Nach dreimaligem Waschen wird das Gel in Wasser gelagert.

Tabelle 8-14: Lösungen für die Zink-Imidazol-Negativ-Färbung.

| Lösungen | Reagenzien | |
|-------------------------------|---|-------------------------------|
| 0,2 M Imidazol-Lösung mit SDS | Imidazol SDS Wasser | 6,81 g 500 mg ad 500 ml |
| 0,2 M Zinksulfat-Lösung | Zinksulfat-7 H ₂ O Wasser | 28,8 g ad 500 ml |

8.4.5.3 IEF und SDS-PAGE (2. Lauf)

Nach der Zink-Imidazol-Negativ-Färbung wurden die Proteinspots des BSA, die die drei höchsten Konzentrationen aufwiesen, innerhalb ihrer Grenzen ausgeschnitten

und jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit einem Stößel zermahlen. Nach Zugabe von Rehydratationspuffer wurden die Proteine im Ultraschallbad aus den Gelstücken eluiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf 350 µl verdünnt und auf einen neuen IPG-Streifen pH 3 – 10 NL aufgetragen. Die IEF und die anschließende Äquilibration erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 8.4.3.1 und Kapitel 8.4.3.2 beschrieben. Für die 2. Dimension, der SDS-PAGE, galten die gleichen Bedingungen wie in Kapitel 8.4.3.3 beschrieben.

8.4.5.4 SDS-PAGE, Färbung und Detektion

Die Gele wurden wie in Kapitel 8.4.3.4 fixiert, mit CCB-Lösung nach Kang [90] gefärbt und entfärbt. Die Detektion erfolgte entsprechend Kapitel 8.4.4.5 bei VIS-NIR.

9. Anhang

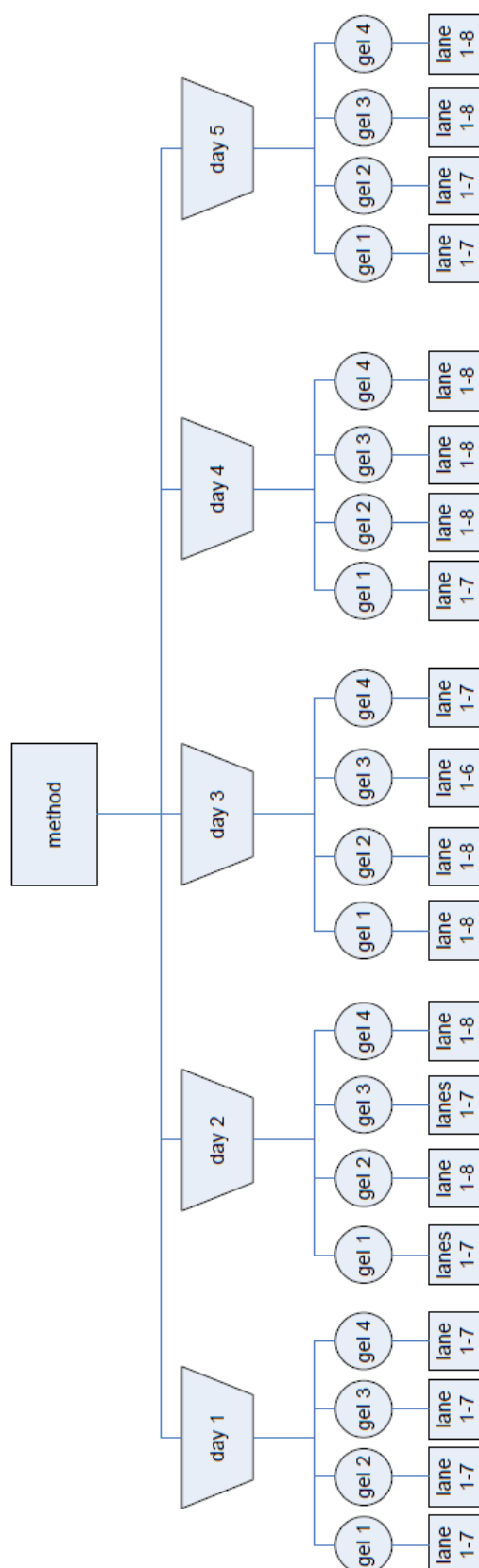


Abbildung 9-1: Beispiel für ein Design einer Varianzanalyse.

Tabelle 9-1 A: Detektor-abhängige Präzision: Odyssey und Fla-9000, Färben und Entfärben bei hoher Schüttelgeschwindigkeit (50 min⁻¹) und Raumtemperatur.

| Proteine | RSD% _{pooled} , hohe Geschwin- digkeit Odyssey [%] | RSD% _{pooled} , hohe Geschwin- digkeit Fla-9000 [%] | F ₀ | F _{crit} | F-test | |
|----------------------------|---|--|----------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| β-Galaktosidase | 2,11 | 2,63 | 1,54 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Phosphorylase b | 3,77 | 2,86 | 1,74 | 4,15 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Bovines Serumalbumin | 2,80 | 2,52 | 1,23 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Glutamin- dehydrogenase | 2,34 | 2,94 | 1,58 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Laktat- dehydrogenase | 1,24 | 1,22 | 1,03 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Carboanhydrase | 1,05 | 1,39 | 1,75 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Trypsininhibitor | 1,53 | 1,85 | 1,45 | 14,25 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Anzahl der Gele | n = 4 | n = 16 | | | | |

Tabelle 9-1 B: Detektor-abhängige Präzision: Odyssey und Fla-9000, Färben und Entfärben bei niedriger Schüttelgeschwindigkeit (30 min⁻¹) und Raumtemperatur.

| Proteine | RSD% pooled, niedrige Geschwin- digkeit Odyssey [%] | RSD% pooled, niedrige Geschwin- digkeit Fla-9000 [%] | F ₀ | F _{crit} | F-test | |
|----------------------------|---|--|----------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| β-Galaktosidase | 4,63 | 5,12 | 1,22 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Phosphorylase b | 4,51 | 5,20 | 1,33 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Bovines Serumalbumin | 4,77 | 2,73 | 3,05 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Glutamin- dehydrogenase | 3,00 | 2,53 | 1,40 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Laktat- dehydrogenase | 2,80 | 1,70 | 2,70 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Carboanhydrase | 2,42 | 1,86 | 1,70 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Trypsininhibitor | 3,26 | 2,57 | 1,60 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Anzahl der Gele | n = 4 | n = 4 | | | | |

Tabelle 9-2 A: Temperatur-abhängige Präzision: Färben und Entfärben bei 4 °C oder Raumtemperatur und bei hoher Schüttelgeschwindigkeit (50 min⁻¹).

| Proteine | RSD% _{pooled} , 4 °C [%] | RSD% _{pooled} , 20 °C [%] | F ₀ | F _{crit} | F-test | |
|------------------------|---|--|----------------|-------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | | | | | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| β-Galaktosidase | 2,49 | 2,54 | 1,22 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Phosphorylase b | 3,86 | 3,05 | 1,33 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Bovines Serumalbumin | 4,93 | 2,57 | 3,05 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Glutamin-dehydrogenase | 2,71 | 2,84 | 1,40 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Laktat-dehydrogenase | 2,23 | 1,22 | 2,70 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Carboanhydrase | 2,16 | 1,33 | 1,70 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Trypsininhibitor | 2,58 | 1,79 | 1,60 | 15,44 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Anzahl der Gele | n = 4 | n = 20 | | | | |

Tabelle 9-2 B: Schüttelgeschwindigkeit-abhängige Präzision, Färben und Entfärben bei hoher (50 min⁻¹) oder niedriger (30 min⁻¹) Schüttelgeschwindigkeit bei Raumtemperatur.

| Proteine | RSD% pooled, niedrige Ge- schwindigkeit [%] | RSD% pooled, hohe Ge- schwindigkeit [%] | F ₀ | F _{crit} | F-test | |
|----------------------------|--|--|----------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | F ₀ > F _{crit} | Signifikanter Unterschied |
| β-Galaktosidase | 4,87 | 2,54 | 3,69 | 3,05 | F ₀ > F _{crit} | Signifikanter Unterschied |
| Phosphorylase b | 4,85 | 3,05 | 2,53 | 3,05 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Bovines Serumalbumin | 3,92 | 2,57 | 2,33 | 3,05 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Glutamin- dehydrogenase | 2,78 | 2,84 | 1,04 | 4,48 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Laktat- dehydrogenase | 2,34 | 1,22 | 3,64 | 3,05 | F ₀ > F _{crit} | Signifikanter Unterschied |
| Carboanhydrase | 2,17 | 1,33 | 2,64 | 3,05 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Trypsininhibitor | 2,95 | 1,79 | 2,70 | 3,05 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Anzahl der Gele | n = 4 | n = 20 | | | | |

Tabelle 9-3: Varianzanalyse der Gesamtvarianz und korrespondierende effektive Freiheitsgrade, Präzision bei hoher Schüttelgeschwindigkeit (50 min⁻¹) und Raumtemperatur (20 Gele, korrespondierend zu Abbildung 4-7 A)

| | | $\hat{\sigma}_{Bande}^2$ df _{Bande} = 128 | $\hat{\sigma}_{Gel}^2$, df _{Gel} = 15 | $\hat{\sigma}_{Tag}^2$, df _{Tag} = 4 | $\hat{\sigma}_{total}^2$ | RSD% total [%] | Effektive Freiheits- grade df _{eff} | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Bande- zu- Bande | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Gel-zu- Gel | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Tag-zu- Tag |
|----------|----|--|---|--|--------------------------|----------------------|---|--|--|--|
| Proteine | 1. | 0,030 | 0,026 | 0,245 | 0,301 | 7,88 | 6 | 10 | 9 | 81 |
| | 2. | 0,053 | 0,052 | 0,037 | 0,142 | 4,93 | 36 | 38 | 36 | 26 |
| | 3. | 0,027 | 0,044 | 0,565 | 0,636 | 12,6 | 5 | 4 | 7 | 89 |
| | 4. | 0,100 | 0,377 | 1,29 | 1,76 | 13,0 | 7 | 6 | 21 | 73 |
| | 5. | 0,114 | 0,238 | 0,302 | 0,653 | 2,97 | 16 | 17 | 37 | 46 |
| | 6. | 0,058 | 0,049 | 0,912 | 1,02 | 5,50 | 4 | 6 | 5 | 89 |
| | 7. | 0,169 | 0,037 | 0,936 | 1,14 | 4,60 | 5 | 15 | 3 | 82 |
| | | | | | | | | | | |

Tabelle 9-4: Varianzanalyse der Gesamtvarianz und korrespondierende effektive Freiheitsgrade, es wurden nur die Daten von Gelen berücksichtigt, die mit der CCB-Lösung gleicher Charge gefärbt wurden (12 Gele, korrespondierend zu Abbildung 4-7 B).

| | Proteine | $\hat{\sigma}_{\text{Bande}}^2$ df _{Bande} = 128 | $\hat{\sigma}_{\text{Gel}}^2$, df _{Gel} = 15 | $\hat{\sigma}_{\text{Tag}}^2$, df _{Tag} = 4 | $\hat{\sigma}_{\text{total}}^2$ | RSD% total [%] | Effektive Freiheits- grade df _{eff} | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Bande- zu- Bande | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Gel-zu- Gel | Anteil an Gesamt- varianz [%]: Tag-zu- Tag |
|----|----------------------------|---|--|---|---------------------------------|----------------------|---|--|--|--|
| 1. | β-Galaktosidase | 0,032 | 0,017 | 0,000 | 0,049 | 3,18 | 52 | 65 | 35 | 0 |
| 2. | Phosphorylase b | 0,051 | 0,039 | 0,000 | 0,090 | 3,89 | 57 | 57 | 43 | 0 |
| 3. | Bovines Serumalbumin | 0,024 | 0,018 | 0,000 | 0,042 | 3,02 | 67 | 56 | 44 | 0 |
| 4. | Glutamin- dehydrogenase | 0,056 | 0,020 | 0,004 | 0,079 | 2,71 | 74 | 70 | 25 | 5 |
| 5. | Laktat- dehydrogenase | 0,109 | 0,221 | 0,000 | 0,330 | 2,09 | 17 | 33 | 67 | 0 |
| 6. | Carboanhydrase | 0,054 | 0,060 | 0,000 | 0,114 | 1,88 | 21 | 47 | 53 | 0 |
| 7. | Trypsininhibitor | 0,146 | 0,064 | 0,028 | 0,239 | 2,15 | 41 | 61 | 26 | 12 |

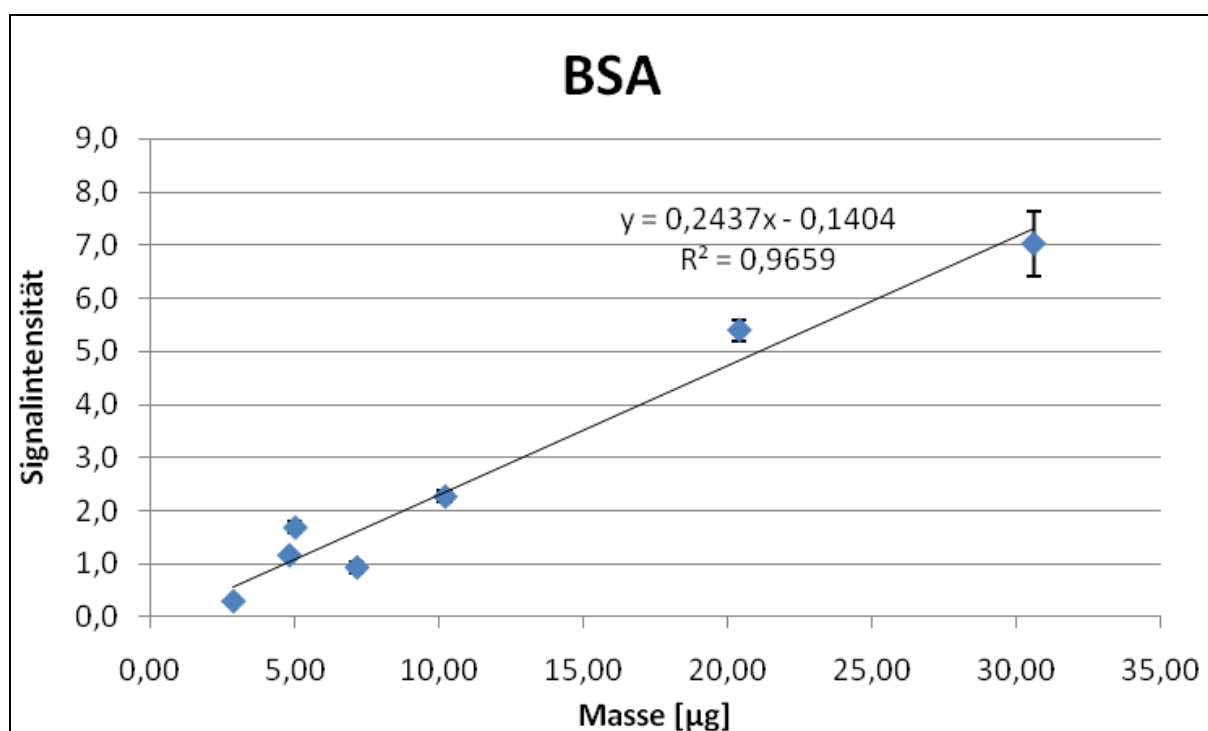


Abbildung 9-2: Linearität, BSA, 2-DE, CCB-Färbung.

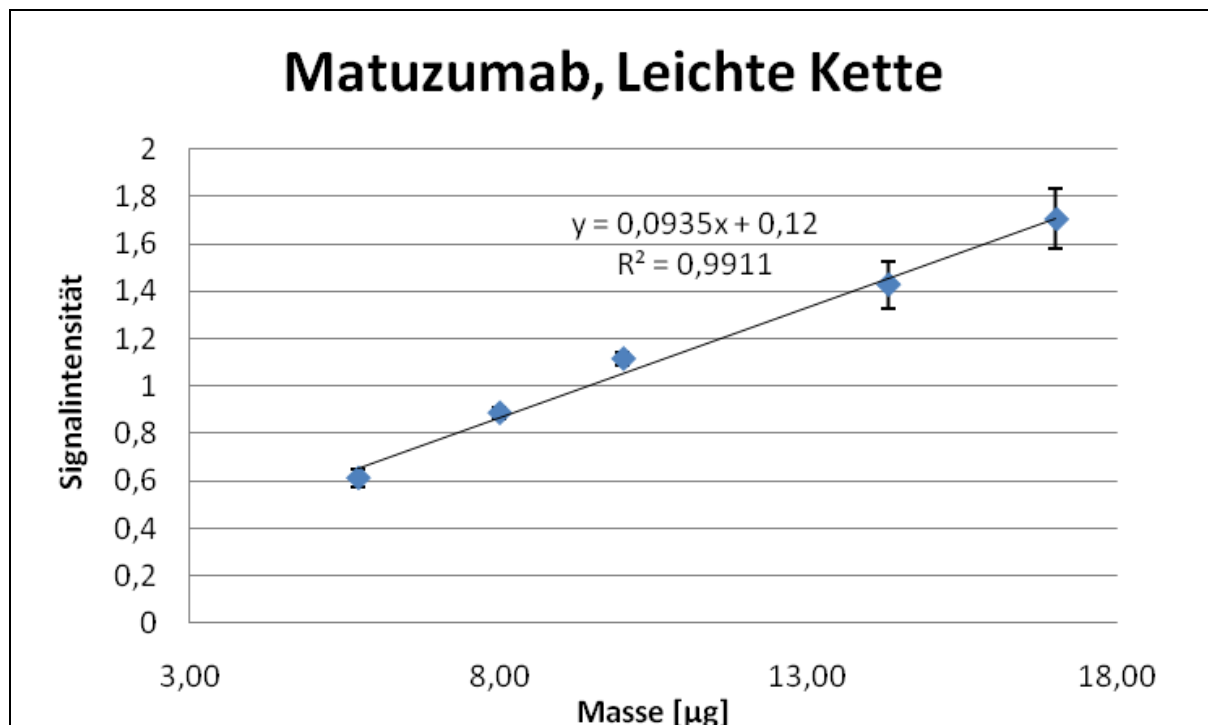


Abbildung 9-3: Linearität, Matuzumab, 2-DE, CCB-Färbung.

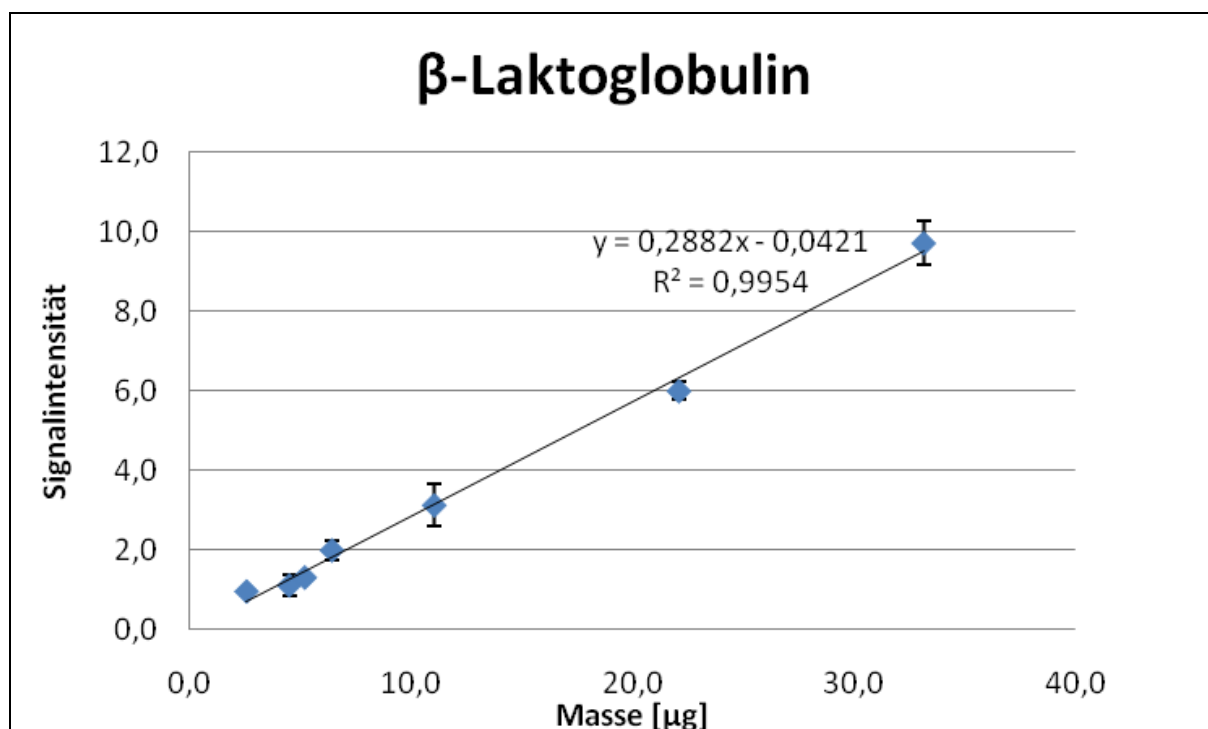


Abbildung 9-4: Linearität, β-Laktoglobulin, 2-DE, CCB-Färbung.

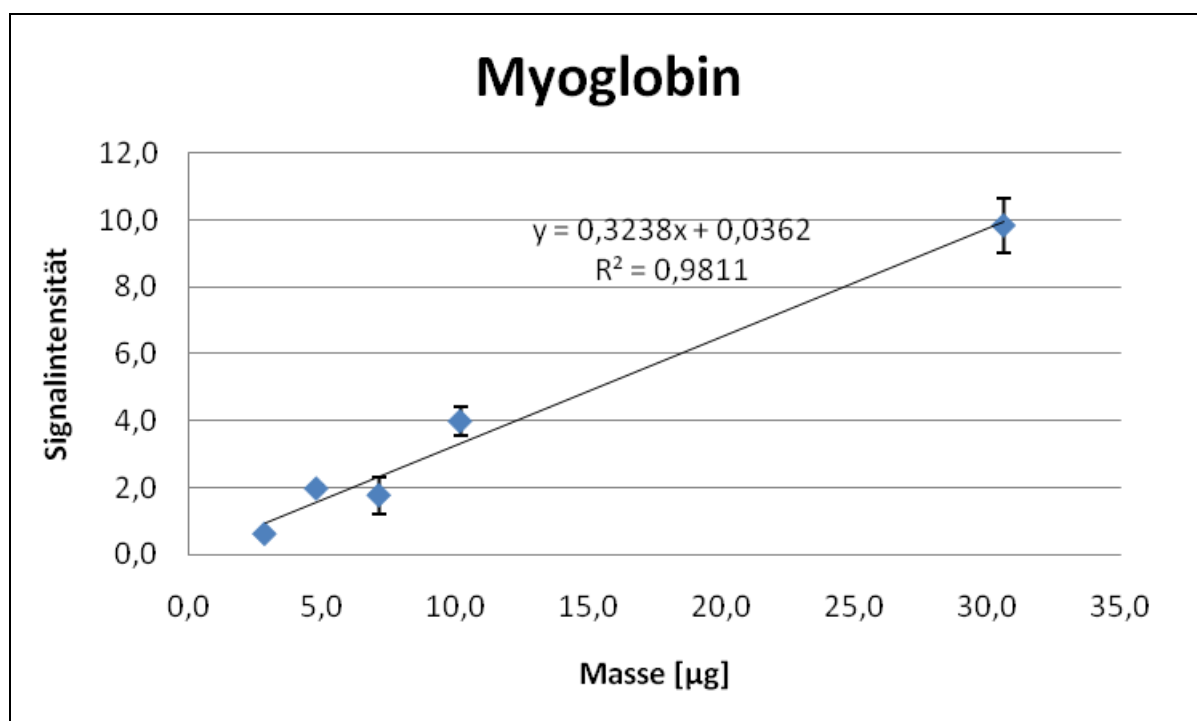


Abbildung 9-5: Linearität, Myoglobin, 2-DE, CCB-Färbung.

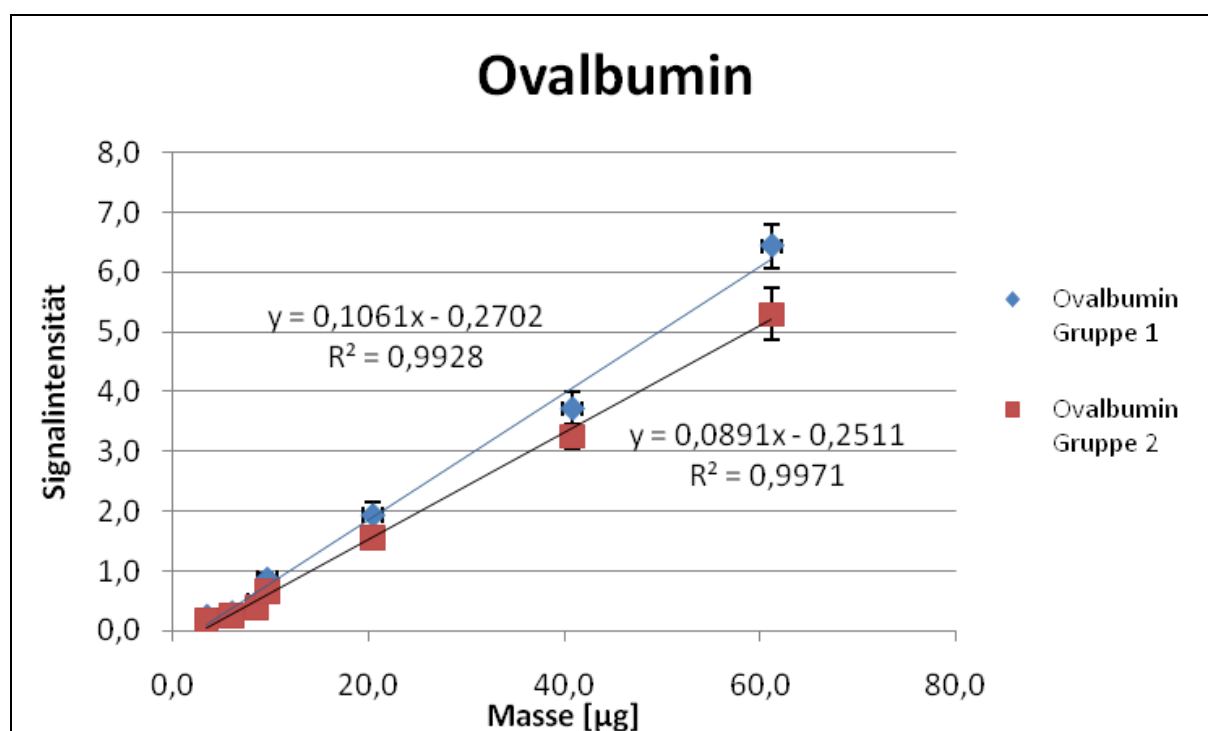


Abbildung 9-6: Linearität, Ovalbumin, 2-DE, CCB-Färbung.

Tabelle 9-5: RSD%_{pooled} mit CISS und Delta2D und Integrationsmethoden I), II) und III); die theoretischen pls wurden mit Expasy pl/Mw tool berechnet (www.expasy.ch).

| Prot. | pl theo. | pl exp. | Integration mit CISS | | | Integration mit Delta2D | | | |
|-------------------------------|-------------|---------------|--|---|---|--|---|------|--|
| Integrationsmethode | | | I) Spot für Spot [RSD% _{pooled}] | II) Summe der Spots [RSD% _{pooled}] | III) Ganze Gruppe [RSD% _{pooled}] | I) Spot für Spot [RSD% _{pooled}] | II) Summe der Spots [RSD% _{pooled}] | | |
| BSA | 5,60 | 5,50- 5,80 | 15,1 | 11,3 | 8,6 | 9,45 | 6,34 | | |
| | | | 11,3 | | | 6,14 | | | |
| | | | 11,5 | | | 7,00 | | | |
| | | | 13,3 | | | 8,80 | | | |
| Oval- bumin Gr. 1 | 5,19 | 4,80- 5,15 | 22,5 | 17,8 | 10,0 | 18,3 | 8,7 | | |
| | | | 12,9 | | | 13,2 | | | |
| | | | 14,3 | | | 12,7 | | | |
| Oval- bumin, Gr. 2 | | | 9,34 | 8,4 | 10,8 | 18,5 | 8,87 | | |
| | | | 7,17 | | | 13,3 | | | |
| | | | 9,46 | | | 9,41 | | | |
| | | | | | | 18,5 | | | |
| Myo- globin | | 7,36 | 7,00 | 18,5 | 20,0 | 16,8 | 25,3 | 16,1 | |
| | | | 7,40 | 21,8 | | | 14,8 | | |
| β- Lakto- globu- lin | 4,83 | 4,90 | - | - | 12,0 | 14,5 | 10,0 | | |
| | | | | | | 15,4 | | | |
| | | 5,00 | - | - | | 15,6 | | | |
| | | | | | | 11,4 | | | |

Tabelle 9-6: Software-abhängige Präzision: CISS und Delta2D mit Integrationsmethode II), Quantifizierung durch Summe der Spots, integriert entlang der Molekularmassen-Achse.

| Protein | CISS II) Summe der Spots [RSD%_{pooled}] | Delta2D II) Summe der Spots [RSD%_{pooled}] | F₀ | F_{crit} | F-Test | |
|----------------------------------|---|--|----------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------|
| BSA n = 24 | 11,3 | 6,34 | 3,178 | 2,124 | $F_0 > F_{crit}$ | Signifikanter Unterschied |
| Ovalbumin, Gruppe 1 n = 24 | 17,8 | 8,70 | 4,183 | 2,124 | $F_0 > F_{crit}$ | Signifikanter Unterschied |
| Ovalbumin, Gruppe 2 n = 24 | 8,40 | 8,87 | 1,121 | 2,124 | $F_0 < F_{crit}$ | Kein signifikanter Unterschied |
| Myoglobin n = 18 | 20,0 | 16,1 | 1,545 | 2,203 | $F_0 < F_{crit}$ | Kein signifikanter Unterschied |
| β-Lakto- globulin n = 24 | - | 10,0 | - | - | - | - |

Tabelle 9-7: Software- und Methoden-abhängige Präzision: CISS mit Integrationsmethode III) Quantifizierung der gesamten Gruppe entlang der pI-Achse; Delta2D mit Integrationsmethode II) Summe aus der Quantifizierung Spot für Spot entlang der Molekularmassen-Achse.

| Protein | CISS III) Ganze Gruppe [RSD%_{pooled}] | Delta2D II) Summe der Spots [RSD%_{pooled}] | F₀ | F_{crit} | F-test | |
|----------------------------------|---|--|----------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|
| BSA n = 24 | 8,60 | 6,34 | 1,841 | 2,124 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Ovalbumin, Gruppe 1 n = 24 | 10,0 | 8,70 | 1,320 | 2,124 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Ovalbumin, Gruppe 2 n = 24 | 10,8 | 8,87 | 1,482 | 2,124 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| Myoglobin n = 18 | 16,8 | 16,1 | 1,090 | 2,203 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |
| β-Lakto- globulin n = 24 | 12,0 | 10,0 | 1,438 | 2,124 | F ₀ < F _{crit} | Kein signifikanter Unterschied |

10. Literaturverzeichnis

- [1] Michov, B., *Elektrophorese: Theorie und Praxis*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1996.
- [2] Shapiro, A. L., Viñuela, E., V. Maizel, J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1967, 28, 815–820.
- [3] O'Farrell, P., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.
- [4] Klose, J., Kobalz, U., *Electrophoresis* 1995, 16, 1034–1059.
- [5] Görg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F., Weiss, W., *Electrophoresis* 2009, 30, 122–132.
- [6] Görg, A., Postel, W., Friedrich, C., Kuick, R., Strahler, J. R., Hanash, S. M., *Electrophoresis* 1991, 12, 653–658.
- [7] Göber, B., Surmann, P. (Eds.), *Arzneimittelkontrolle: Grundlagen und Methoden der Prüfung und Standardisierung von Arzneimitteln*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2005.
- [8] Isaaq, H. J., Waybright, T. J., Veenstra, T. D., *Electrophoresis* 2011, 32, 967–975.
- [9] Rehm, H., Letzel, T. (Eds.), *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010.
- [10] Koller, A., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 2470–2475.
- [11] International Conference on Harmonisation, *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* 2005, www.ich.org.
- [12] Wätzig, H., *PZ Prisma* 2002, 9, 240–244.
- [13] Mahon, P., Dupree, P., *Electrophoresis* 2001, 22, 2075–2085.
- [14] vfa - Die forschenden Pharma-Unternehmen, *Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel* 2011, www.vfa.de/gentech.
- [15] Zhou, S., Mann, C. J., Dunn, M. J., Preedy, V. R., Emery, P. W., *Electrophoresis* 2006, 27, 1147–1153.
- [16] Eravci, M., Fuxius, S., Broedel, O., Weist, S., Eravci, S., Mansmann, U., Schluter, H., Tiemann, J., Baumgartner, A., *Proteomics* 2007, 7, 513–523.

- [17] Challapalli, K. K., Zabel, C., Schuchhardt, J., Kaendl, A. M., Klose, J., Herzel, H., *Electrophoresis* 2004, 25, 3040–3047.
- [18] Schröder, S., Zhang, H., Yeung, E. S., Jänsch, L., Zabel, C., Wätzig, H., *J. Proteome Res.* 2008, 7, 1226–1234.
- [19] Valcu, C.-M., Valcu, M., *J. Proteome Res.* 2007, 6, 4677–4683.
- [20] Schröder, S., Brandmüller, A., Deng, X., Ahmed, A., Wätzig, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50, 320–327.
- [21] Luo, S., Wehr, N. B., Levine, R. L., *Anal. Biochem.* 2006, 350, 233–238.
- [22] Harris, L. R., Churchward, M. A., Butt, H. R., Coorssen, J. R., *J. Proteome Res.* 2007, 6, 1418–1425.
- [23] Schröder, S., *Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle*, Dissertation, Braunschweig 2009.
- [24] Deng, X., Schröder, S., Redweik, S., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2011, 32, 1667–1674.
- [25] Deng, X., Hahne, T., Schröder, S., Redweik, S., Nebija, D., Schmidt, H., Janssen, O., Lachmann, B., Wätzig, H., *Electrophoresis, im Druck*.
- [26] Sickmann, A., Dormeyer, W., Wortelkamp, S., Woitalla, D., Kuhn, W., Meyer, H. E., *J. Chromatogr., B* 2002, 771, 167–196.
- [27] Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, J. G. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 7342–7372.
- [28] Cejka, J., Vodrazka, Z., Salak, J., *Biochim. Biophys. Acta* 1968, 154, 589–591.
- [29] Perdivara, I., Deterding, L. J., Przybylski, M., Tomer, K. B., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2010, 21, 1114–1117.
- [30] Paton, L. N., Gerrard, J. A., Bryson, W. G., *J. Proteomics* 2008, 71, 513–529.
- [31] Lutter, P., Meyer, H. E., Langer, M., Witthohn, K., Dormeyer, W., Sickmann, A., Blüggel, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 2888–2897.
- [32] Sachs, L., Hedderich, J., *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2006.
- [33] Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H., *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik ; mit zahlreichen, vollständig durchgerechneten Beispielen*, Oldenbourg, München, Wien 2005.
- [34] Chuang-Stein, C., *Stat. Biopharm. Res.* 2010, 2, 145–152.
- [35] United States Pharmacopeial Convention, *USP Pharmacists' Pharmacopeia*, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda 2009.

- [36] U.S. Department of Health and Human Services, Federal Department of America, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Center for Veterinary Medicine (CVM), *Guidance for Industry Process Validation* 2011.
- [37] Guha, R., Dutta, D., Jurs, P. C., Chen, T., *J. Chem. Inf. Model.* 2006, 46, 1713–1722.
- [38] Lottspeich, F., Engels, J. W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg 2006.
- [39] Walsh, G., *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 769–776.
- [40] Leader, B., Baca, Q. J., Golan, D. E. 2008, 7, 21–39.
- [41] Kayser, O., *Grundwissen pharmazeutische Biotechnologie*, Teubner, Stuttgart 2002.
- [42] Walsh, G., *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 917–924.
- [43] Schlags, W., Lachmann, B., Walther, M., Kratzel, M., Noe, C. R., *Proteomics* 2002, 2, 679–682.
- [44] Nebija, D., *Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) and MALDI-TOF-MS analysis of rDNA derived, therapeutic monoclonal antibodies trastuzumab and rituximab and fusion protein abatacept*, Dissertation, Wien 2008.
- [45] Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, *European pharmacopoeia*, Council Of Europe; European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg 2011.
- [46] Hodgkinson, V. C., Eagle, G. L., Drew, P. J., Lind, M. J., Cawkwell, L., *Cancer Lett.* 2010.
- [47] López, J. L., *J. Chromatogr. B* 2007, 849, 190–202.
- [48] Jungblut, P., Schlüter, H., *Biospektrum* 2008, 14, 37–40.
- [49] Wong, S. F., *Clin. Ther.* 2005, 27, 684–694.
- [50] Bracht, K., *Pharmazeutische Zeitung* 2009, 145, 17–25.
- [51] Vasudev, N. S., Ferguson, R. E., Cairns, D. A., Stanley, A. J., Selby, P. J., Banks, R. E., *Proteomics* 2008, 8, 5074–5085.
- [52] Chen, C., Su, Y., Huang, T., Ho, H., Chang, Y., Tung, Y., Lee, W., *Clin. Chim. Acta* 2008, 398, 48–52.

- [53] Goldknopf, I. L., Bryson, J. K., Strelets, I., Quintero, S., Sheta, E. A., Mosqueda, M., Park, H. R., Appel, S. H., Shill, H., Sabbagh, M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2009, 389, 321–327.
- [54] Lambert, J.-P., Ethier, M., Smith, J. C., Figeys, D., *Anal. Chem* 2005, 77, 3771–3788.
- [55] Penque, D., *Prot. Clin. Appl* 2009, 3, 155–172.
- [56] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, 31, 174–191.
- [57] Lacher, N. A., Roberts, R. K., He, Y., Cargill, H., Kearns, K. M., Holovics, H., Ruesch, M. N., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 218–227.
- [58] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 1017–1031.
- [59] Caldini, A., Moneti, G., Fanelli, A., Bruschetini, A., Mercurio, S., Pieraccini, G., Cini, E., Ognibene, A., Luceri, F., Messeri, G., *Proteomics* 2003, 3, 937–941.
- [60] Wang, M., You, J., Bemis, K. G., Tegeler, T. J., Brown, D. P. G., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2008, 7, 329–339.
- [61] Fey, S., Larsen, P. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 26–33.
- [62] Westermeier, R., *Elektrophorese-Praktikum*, VCH, Weinheim ;, New York 1990.
- [63] Holmes, D. L., Stellwagen, N. C., *Electrophoresis* 1991, 12, 612–619.
- [64] Röchel, R., *J. Chromatogr. A* 1978, 166, 563–575.
- [65] Gerstein, A. S., *Molecular biology problem solver: A laboratory guide*, Wiley-Liss, New York 2001.
- [66] Ornstein, L., *Ann. NY. Acad. Sci.* 1964, 121, 321–349.
- [67] Davis, B., *Ann. NY. Acad. Sci.* 1964, 121, 404–427.
- [68] Geckeler, K. E., Eckstein, H., *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, Wiesbaden 1998.
- [69] Schwedt, G., *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-VCH, Weinheim 2004.
- [70] Denhardt, D., Crawford, L., *Journal of Virol.* 1980, 34, 315–329.
- [71] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [72] Reynolds, J. A., Tanford, C., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1970, 66, 1002–1007.
- [73] Vesterberg, O., *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure* 1972, 257, 11–19.

- [74] Richter, G., *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003.
- [75] Hames, B. D., *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, Oxford University Press, Oxford, New York 1998.
- [76] Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., *Proteomics* 2004, 4, 3665–3685.
- [77] Westermeier, R., Schickle, H., *Arch. Physiol. Biochem.* 2009, 115, 279–285.
- [78] Görg, A., *Trends in Biotechnology* 2000, 18, 3–6.
- [79] Shaw, M. M., Riederer, B. M., *Proteomics* 2003, 3, 1408–1417.
- [80] Barry, R. C., Alsaker, B. L., Robison-Cox, J. F., Dratz, E. A., *Electrophoresis* 2003, 24, 3390–3404.
- [81] Echan, L. A., Speicher, D. W., *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2002, 29, 10.5.1–10.5.18.
- [82] Joo, W.-A., Speicher, D. W., *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2007, 48, 10.6.1–10.6.9.
- [83] Smejkal, G. B., *Expert Rev. Proteomics* 2004, 1, 381–387.
- [84] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., *Electrophoresis* 1988, 9, 255–262.
- [85] Weiss, W., Weiland, F., Görg, A., in: *Meth. Mol. Biol.* 2009; 564, 59–82.
- [86] Westermeier, R., *Practical Proteomics* 2006, 1-2, 61–64.
- [87] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2004, 25, 1327–1333.
- [88] Pink, M., Verma, N., Rettenmeier, A. W., Schmitz-Spanke, S., *Electrophoresis* 2010, 31, 593–598.
- [89] Rabilloud, T. (Ed.), *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 2000.
- [90] Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., Kang, C., *Bull. Korean Chem. Soc.* 2002, 23, 1511–1512.
- [91] Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., Papapostolou, I., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 391–403.
- [92] Dyballa, N., Metzger, S., *Jove* 2009, 30.
- [93] Poehling, H.-M., Neuhoff, V., *Electrophoresis* 1981, 2, 141–147.
- [94] Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S., Sickmann, A., *Electrophoresis* 2007, 28, 2095–2099.

- [95] Westermeier, R., Marouga, R., *Biosci. Rep.* 2005, 25, 19–32.
- [96] Chevalier, F., *Proteome Sci.* 2010, 8, 23.
- [97] Grove, H., Faergestad, E. M., Hollung, K., Martens, H., *Electrophoresis* 2009, 30, 1856–1862.
- [98] Dutt, M., Lee, K. H., *Electrophoresis* 2001, 22, 1627–1632.
- [99] Patton, W. F., Beechem, J. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 6, 63–69.
- [100] Rabilloud, T., Strub, J.-M., Luche, S., van Dorsselaer, A., Lunardi, J., *Proteomics* 2001, 1, 699–704.
- [101] Aude-Garcia, C., Collin-Faure, V., Luche, S., Rabilloud, T., *Proteomics* 2011, 11, 324–328.
- [102] Steinberg, T. H., *Meth. Enzymol* 2009, 463, 541–563.
- [103] Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E., *Proteomics* 2006, 6, 5385–5408.
- [104] Ball, M. S., Karuso, P., *J. Proteome Res* 2007, 6, 4313–4320.
- [105] Nock, C., Ball, M., White, I., Skehel, J., Bill, L., Karuso, P., *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22, 881–886.
- [106] Baudouin-Cornu, P., Lagniel, G., Chédin, S., Labarre, J., *Proteomics* 2009, 9, 4606–4615.
- [107] Patton, W. F., *J. Chromatogr. B* 2002, 771, 3–31.
- [108] Timms, J. F., Cramer, R., *Proteomics* 2008, 8, 4886–4897.
- [109] McNamara, L. E., Dalby, M. J., Riehle, M. O., Burchmore, R., *J. R. Soc. Interface* 2010, 7, 107–118.
- [110] Ünlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., *Electrophoresis* 1997, 18, 2071–2077.
- [111] Patton, W. F., *Electrophoresis* 2000, 21, 1123–1144.
- [112] Miller Jr., M. D., Acey, R. A., Lee, L. Y.-T., Edwards, A. J., *Electrophoresis* 2001, 22, 791–800.
- [113] Olive, M., *www.licor.com* 2006.
- [114] Tan, H. Y., Ng, T. W., Liew, O. W., *Biotech.* 2007, 42, 474–478.
- [115] Ermer, J., Miller, J. H. M., *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- [116] Wätzig, H., Ermer, J., *PZ Prisma* 2003, 11, 257–265.
- [117] Schepers, U., Ermer, J., Preu, L., Wätzig, H., *J. Chromatogr. B* 2004, 810, 111–118.

- [118] Wätzig, H., Mehnert, W., Bühler, W., *Mathematik und Statistik kompakt: Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin ; mit 55 Tabellen*, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 2009.
- [119] Pospeschill, M., *Statistische Methoden: Strukturen, Grundlagen, Anwendungen in Psychologie und Sozialwissenschaften*, Spektrum Akad. Verl., München 2006.
- [120] Wätzig, H., in: Nürnberg, E., Surmann, P. (Eds.), *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer Verlag, Heidelberg 1991.
- [121] Pearson, R. K., *Mining imperfect data: Dealing with contamination and incomplete records*, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia 2005.
- [122] Barnett, V., Lewis, T., *Outliers in statistical data*, Wiley, Chichester 1984.
- [123] Schulz-Trieglaff, O., Machtejevas, E., Reinert, K., Schlüter, H., Thiemann, J., Unger, K., *BioData Min.* 2009, 2, 4.
- [124] Shieh, A. D., Hung, Y. S., *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2009, 8, 13.
- [125] Hayes, K., Kinsella, A., Coffey, N., *Clin. Biochem.* 2007, 40, 147–152.
- [126] Wetherbee, G. A., Shaw, M. J., Latysh, N. E., Lehmann, C. M. B., Rothert, J. E., *Environ Monit Assess* 2010, 164, 111–132.
- [127] Moritz, B., Meyer, H. E., *Proteomics* 2003, 3, 2208–2220.
- [128] Bermúdez-Crespo, J., López, J. L., *Prot. Clin. Appl* 2007, 1, 983–1003.
- [129] Horgan, G. W., *J. Proteome Res.* 2007, 6, 2884–2887.
- [130] Karp, N. A., McCormick, P. S., Russell, M. R., Lilley, K. S., *Mol. Cell. Proteomics* 2007, 6, 1354–1364.
- [131] Stead, D. A., Paton, N. W., Missier, P., Embury, S. M., Hedeler, C., Jin, B., Brown, A. J. P., Preece, A., *Brief. Bioinform.* 2007, 9, 174–188.
- [132] Cairns, D. A., *Proteomics* 2011, 11, 1037–1048.
- [133] Righetti, P. G., Boschetti, E., Lomas, L., Citterio, A., *Proteomics* 2006, 6, 3980–3992.
- [134] Nebija, D., Urban, E., Stessl, M., Noe, C. R., Lachmann, B., *Electrophoresis* 2011, 32, 1438–1443.
- [135] Turck, C. W., Falick, A. M., Kowalak, J. A., Lane, W. S., Lilley, K. S., Phinney, B. S., Weintraub, S. T., Witkowska, H. E., Yates, N. A., *Mol. Cell. Proteomics* 2009, 6.8, 1291–1298.

- [136] Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S. J., Larsen, P. M., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., Posch, A., *Electrophoresis* 1995, 16, 1935–1945.
- [137] Nishihara, J. C., Champion, K. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 2203–2215.
- [138] Molloy, M. P., Brzezinski, E. E., Hang, J., McDowell, M. T., VanBogelen, R. A., *Proteomics* 2003, 3, 1912–1919.
- [139] Carette, O., Burkhard, P. R., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., *Nat. Protoc.* 1, 2006, 812–824.
- [140] Millionni, R., Sbrignadello, S., Tura, A., Iori, E., Murphy, E., Tessari, P., *Electrophoresis* 2010, 31, 1739–1742.
- [141] Canas, B., Pineiro, C., Calvo, E., Lopez-Ferrer, D., Gallardo, J. M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1153, 235–258.
- [142] Fagner, D., Zomorodi, M., Kües, U., Majcherczyk, A., *Electrophoresis* 2009, 30, 2431–2441.
- [143] Ahmad, Y., Sharma, N., *J. Proteomics Bioinform.* 2009, 2, 495–499.
- [144] Bland, A. M., D'Eugenio, L. R., Dugan, M. A., Janech, M. G., Almeida, J. S., Zile, M. R., Arthur, J. M., *J. Biomol. Tech.* 2006, 17, 195–199.
- [145] Fuxius, S., *Experimente zur Optimierung der Methodik der zweidimensionalen Gelelektrophorese*, Dissertation, Berlin 2007.
- [146] Polaskova, V., Kapur, A., Khan, A., Molloy, M. P., Baker, M. S., *Electrophoresis* 2010, 31, 471–482.
- [147] Zhou, S., Bailey, M. J., Dunn, M. J., Preedy, V. R., Emery, P. W., *Proteomics* 2005, 5, 2739–2747.
- [148] Roegerer, J., Lutter, P., Reinhardt, R., Blüggel, M., Meyer, H. E., Anselmetti, D., *Anal. Chem.* 2003, 75, 157–159.
- [149] Zhang, H., Yeung, E. S., *Electrophoresis* 2006, 27, 3609–3618.
- [150] Lilley, K. S., Razzaq, A., Dupree, P., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 6, 46–50.
- [151] Amiot, C. L., Xu, S., Liang, S., Pan, L., Zhao, J. X., *Sensors* 2008, 8, 3082–3105.
- [152] United States Environmental Protection Agency, *Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOPs): EPA QA/G-6* 2007.
- [153] Jones, A. R., Gibson, F., *Proteomics* 2007, 1, 35–40.
- [154] Splett, J. D., Wang, C. M., *J. Test Eval* 2006, 34, 1–4.
- [155] Besir, B., *Lab Times* 2008, 2008/6, 53.

- [156] Horwitz, W., *Anal. Chem.* 1982, 54, 67A-76A.
- [157] Barwick, V. L., Ellison, S. L. R., in: *LGC (Teddington) Limited 2000*.
- [158] Pantazopoulos, P., *Appendix 1: Uncertainty estimate for: Procedure ONT-FCL-0024: "Determination of ochratoxin A in wine and grape juice by high performance liquid chromatography with fluorescence detection* 2001, 17–22.
- [159] Tabb, D. L., *An algorithm for isoelectric point estimation* 2001, http://www.worldinfocus.net/Papers/Proteomics/An_algorithm_for_isoelectric_point_estimation.pdf.
- [160] Kozlowski, L., *Calculation of protein isoelectric point* 2008, <http://isoelectric.ovh.org/index.html>.
- [161] Schmidt, H., Gelhaus, C., Latendorf, T., Nebendahl, M., Petersen, A., Krause, S., Leippe, M., Becker, W.-M., Janssen, O., *Proteomics* 2009, 9, 3507–3521.
- [162] Mann, M., Jensen, O. N., *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 255–261.
- [163] Seo, J., Lee, K.-J., *J. Biochem. Mol. Biol.* 2004, 37, 35–44.
- [164] Casanovas, A., Carrascal, M., Abián, J., López-Tejero, M. D., Llobera, M., *Journal of Proteomics* 2009, 72, 1031–1039.
- [165] Sickmann, A., Marcus, K., Schäfer, H., Butt-Dörje, E., Lehr, S., Herkner, A., Suer, S., Bahr, I., Meyer, H. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 1669–1676.
- [166] Larsen, M. R., Roepstorff, P., *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 677–690.
- [167] Küster, B., Krogh, T. N., Mortz, E., Harvey, D. J., *Proteomics* 2001, 1, 350–361.
- [168] Barrabés, S., Sarrats, A., Fort, E., Llorens, R. de, Rudd, P. M., Peracaula, R., *Electrophoresis* 2010, 31, 2903–2912.
- [169] Temporini, C., Calleri, E., Massolini, G., Caccialanza, G., *Mass Spectrom. Rev.* 2008, 27, 207–236.
- [170] Chang, W. W. P. H. C., Bomberger, D. C., Schneider, L. V., *Electrophoresis* 2005, 26, 2179–2186.
- [171] Crow, J. A., Middleton, B. L., Borazjani, A., Hatfield, M. J., Potter, P. M., Ross, M. K., *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1781, 643–654.
- [172] Kleinert, P., Kuster, T., Arnold, D., Jaeken, J., Heinzmann, C. W., Troxler, H., *Proteomics* 2007, 7, 15–22.
- [173] Lee, D.-Y., Chang, G.-D., *Anal. Chem.* 2009, 91, 3957–3964.
- [174] Lippincott, J., Apostol, I., *Anal. Biochem.* 1999, 267, 57–64.
- [175] Righetti, P. G., *J. Chromatogr., B* 2006, 841, 14–22.

- [176] McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., Williams, K., Herbert, B., *J. Proteome Res.* 2003, 2, 239–242.
- [177] Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., Voigt, J., *Plant. Physiol.* 1987, 83, 557–563.
- [178] Maresso, A. W., Riese, M. J., Barbieri, J. T., *Biochem.* 2003, 42, 14249–14257.
- [179] Rockwell, K. R., Huber, B. T., *Mol. Immunol.* 2009, 46, 1605–1612.
- [180] Wait, R., Miller, I., Eberini, I., Cairoli, F., Veronesi, C., Battocchio, M., Gemeiner, M., Gianazza, E., *Electrophoresis* 2002, 23, 3418–3427.
- [181] Rémy, A., Imam-Sghiouar, N., Poirier, F., Joubert-Caron, R., *Bio-Rad bulletin* 2000, 2778.
- [182] Scheler, C., Li, X. P., Salnikow, J., Dunn, M. J., Jungblut, P., *Electrophoresis* 1999, 20, 3623–3628.
- [183] Scheler, C., Müller, E.-C., Stahl, J., Müller-Werdan, U., Salnikow, J., Jungblut, P., *Electrophoresis* 1997, 18, 2823–2831.
- [184] Altland, K., Roeder, T., Jakin, H. M., Zimmer, H. G., Neuhoff, V., *Clin. Chem.* 1982, 28, 1000–1010.
- [185] Hashimoto, S., Asao, T., Takahashi, J., Yagihashi, Y., Nishimura, T., Saniabadi, A. R., Poland, D. C. W., van Dijk, W., Kuwano, H., Kochibe, N., Yazawa, S., *Cancer* 2004, 101, 2825–2836.
- [186] Pessen, H., Purcell, J. M., Farrell Jr., H. M., *Biochim. Biophys. Acta* 1982, 828, 1–12.
- [187] Casal, H. L., Köhler, U., Mantsch, H. H., *Biochim. Biophys. Acta* 1988, 957, 11–20.
- [188] Osborne, J. W., *Newborn and Infant Nursing Reviews* 2010, 10, 37–43.
- [189] Concept Heidelberg (Ed.), *GMP-/FDA-Anforderungen an die Qualitätssicherung*, ECV, Editio-Cantor-Verl., Aulendorf 2009.
- [190] Iglewicz, B., Hoaglin, D. C., *How to detect and handle outliers*, ASQC Quality Press, Milwaukee, Wis 1993.
- [191] National Institute of Standards and Technology, *Extreme studentized deviate test* 2010,
<http://www.itl.nist.gov/div898/software/dataplot/refman1/auxillar/esd.htm>.
- [192] Rechenberg, W., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1982, 311, 590–597.

- [193] Walfish, S., *A Review of Statistical Outlier Methods* 2006,
<http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=384716>.
- [194] Conklin, J. D., *Quality Progress: Smart Project Selection* 2003, 81–83.
- [195] Analytical Methods Committee, *Robust statistics: a method of coping with outliers* 2001, http://www.rsc.org/images/brief6_tcm18-25948.pdf.
- [196] Seo, S., *A Review and Comparison of Methods for Detecting Outliers in Univariate Data Sets*, Masterarbeit, Pittsburgh 2006.
- [197] Rinne, H., *Taschenbuch der Statistik*, Harri Deutsch Verlag, Frankfurt am Main 2008.
- [198] Fawcett, T., *ROC Graphs: Notes and Practical Considerations for Researchers* 2004.
- [199] Burke, S., *LC GC Europe online Suppl* 2001, 59, 19–24.
- [200] Healy, M. J. R., *Clin. Chem.* 1979, 25, 675–677.
- [201] Schirm, B., Wätzig, H., *Chromatographia* 1998, 48, 331–346.
- [202] Amersham Biosciences, *Hoefer DALT System: User Manual* 1998,
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/81DA76686EF3DC38C1257628001CE489/\\$file/80643150.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/81DA76686EF3DC38C1257628001CE489/$file/80643150.pdf).

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Xi Deng
Geburtsdatum: 01.05.1982
Geburtsort: Shanghai, China

Beruflicher Werdegang

01/2008 – 07/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

07/2011 Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

12/2007 Approbation als Apothekerin

05/2007 – 10/2007 Zweiter Abschnitt der praktischen Ausbildung: Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt am Main

11/2006 – 04/2007 Erster Abschnitt der praktischen Ausbildung: Apotheke K 10, Braunschweig

Hochschulstudium

10/2002 – 09/2006 Pharmazie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig

Schulausbildung

08/1995 – 06/2002 Gymnasium Carolinum, Osnabrück